

Analyse einzelner Phasen des RNA Polymerase III Transkriptionszyklus

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stephan Weser
aus Lübeck

Marburg / Lahn, 2000

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) in Marburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. K. H. Seifart durchgeführt.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Gerhard Heldmaier

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart

1.	Einleitung	1
1.1.	Transkription in der eukaryonten Zelle	1
1.2.	Die RNA-Polymerase III	2
1.3.	Die Polymerase III abhängigen Gene, ihre Promotorstrukturen und die beteiligten Transkriptionsfaktoren	3
1.3.1.	tRNA-Gene, VAI- und VAII- sowie andere Gene mit AB-Typ Promotor	3
1.3.2.	Das 5S-rRNA-Gen (AC-Typ)	5
1.3.3.	Gene mit 5'-gelegenen Promotoren	7
1.4.	Die Transkriptionsfaktoren der klassischen Pol III Gene	8
1.4.1.	TFIIIC	8
1.4.2.	TFIIIB	11
1.4.3.	TFIIIA	12
1.5.	Der Polymerase III Transkriptionskomplex	13
1.5.1.	Die sequenzielle Anlagerung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor	13
1.5.2.	Einbindung der RNA-Polymerase in den Präinitiationskomplex und Initiation der RNA-Synthese	14
1.5.3.	Elongation der RNA und Termination der Transkription	16
1.5.4.	Erleichterte Reinitiation der Pol III Transkriptionskomplexe	17
1.6.	La und die ersten Schritte der RNA-Reifung	18
1.7.	Zielsetzung	20
2.	Material und Methoden	21
A.	Material	21
B.	Methoden	26
2.1.	Anzucht und Stammhaltung von Bakterien	26
2.2.	Arbeiten mit Nukleinsäuren	26

2.2.1.	Präparation von Plasmid-DNA (aus <i>E. coli</i>) für analytische Zwecke („Mini-Screen“)	26
2.2.2.	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	27
2.2.3.	Standardbedingungen zur Fällung von Nukleinsäuren	27
2.2.4.	Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren	27
2.2.5.	Spaltung mit Restriktionsenzymen	28
2.2.6.	Anfärbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid	28
2.2.7.	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen mittels Elektroelution	28
2.2.8.	Dephosphorylierung von linearer DNA	29
2.2.9.	Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden	29
2.2.10.	Ligationsreaktion	29
2.2.11.	Transformation	30
2.2.12.	Selektion positiver Transformanten	30
2.2.13.	DNA-Sequenzanalyse	31
2.2.14.	PCR	31
2.2.15.	Radioaktive 5'-Endmarkierung von ds oder ssDNA	32
2.2.16.	Abtrennung der freien Nukleotide von DNA-Fragmenten	33
2.2.17.	Abtrennung nicht-inkorporierter Oligonukleotide von PCR-Produkten	33
2.3.	Gelelektrophoretische Methoden	33
2.3.1.	Agarosegele	33
2.3.2.	Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	33
2.3.3.	Nichtdenaturierende Polyacrylamidgele zur nativen DNA-Auftrennung	34
2.3.4.	Nicht denaturierende Gele zur Auftrennung von nativen Protein-DNA Komplexen	35
2.3.5.	SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (nach Laemmli, 1970)	35
2.4.	Zellkultur	36
2.4.1.	Anzucht menschlicher Tumorzellen in Suspensionskultur	36
2.4.2.	Expression monoklonaler Antikörper	37
2.5.	Präparation zellfreier Extrakte	37
2.5.1.	Präparation von zellfreiem Extrakt (S100) aus HeLa oder HEK	37

	Zellen (nach Weil et al., 1979)	
2.5.2.	Präparation von Kernextrakt	38
2.6.	Arbeiten mit Proteinen	39
2.6.1.	Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat	39
2.6.2.	Proteinkonzentrationsbestimmung durch kolorimetrische Proteinquantifizierung (Bradford, 1976)	39
2.6.3.	Dialyse von Proteinlösungen	39
2.6.4.	Reinigung von Proteinfractionen über Niederdruck- Chromatographie (Liquid Chromatography, LC), Phosphocellulose	40
2.6.5.	Reinigung von Proteinfractionen über Mitteldruck- Chromatographie	40
2.6.5.1.	Anionentauscher	40
2.6.5.2.	Kationentauscher	41
2.6.5.3.	Gelfiltration (analytisch)	41
2.6.5.4.	Heparin Fractogel	42
2.6.6.	Präparation der Transkriptionsfaktoren und anderer Proteine	42
2.6.6.1.	Präparation von TFIIIA (nach Seifart et al., 1989)	42
2.6.6.2.	Weitere chromatographische Trennung der PCB und PCC	42
2.6.6.3.	Präparation von TFIIIB β und Polymerase III	43
2.6.6.4.	weitere Reinigung von TFIIIC1, TFIIIC2 und TFIIIC0	43
2.6.6.5.	Partielle Reinigung von La aus der PCA	43
2.6.7.	Isolierung von Transkriptionskomplexen durch Glyzeringradientenzentrifugation	44
2.6.8.	Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridoma- Zellüberständen	45
2.6.9.	Reinigung von IgGs aus Kaninchen-Serum	45
2.6.10.	Irreversible Immobilisierung von Antikörpern an HiTrap ProteinA Säulen bzw. an ProteinA-Sepharose	46
2.6.11.	Immunodepletion mittels Säulenchromatographie	46
2.6.12.	Immunopräzipitation von RNA-La-Komplexen	47
2.6.13.	Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot)	48
2.6.13.1.	Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf PVDF- Transfermembran	48

2.6.13.2.	Nachweis spezifischer Proteine durch Antigen-Antikörper Wechselwirkung	49
2.6.14.	Konzentrieren von Proteinlösungen für SDS-Gelelektrophorese mit Strataclean™ Resin	50
2.6.15.	Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue	50
2.6.16.	Silberfärbung von Proteingelen nach Blum et al., 1987	51
2.7.	<i>In vitro</i> Transkription	51
2.7.1.	Spezifische <i>in vitro</i> Transkription	51
2.7.2.	Transkription an immobilisierten DNA-Matrizen	53
2.7.2.1.	Kopplung der DNA	53
2.7.2.2.	Transkription an immobilisierter Matriz	54
2.7.2.3.	Elution von assemblierten Transkriptionskomplexen	54
2.7.3.	Aufarbeitung von RNA aus <i>in vitro</i> Transkriptions- und Immunopräzipitationsansätzen	55
2.7.4.	Unspezifische <i>in vitro</i> Transkription („Polymerase-Test“)	56
2.8.	Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen	57
2.8.1.	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)	57
2.8.2.	EMSA an einzelsträngiger DNA (Oligonukleotiden)	58
2.9.	Bestimmung radioaktiver Strahlung	59
2.9.1.	qualitativ durch Autoradiographie	59
2.9.2.	quantitativ durch Bestimmung der Szintillationsstrahlung	59
2.9.3.	qualitativ und quantitativ mittels Analyse durch einen Phosphor Imager	59
3.	Ergebnisse	60
3.1.	Analyse der Phasen des humanen Transkriptionszyklus	60
3.1.1.	Arretierung und Reaktivierung von Transkriptionskomplexen zu Beginn der Elongationsphase	60
3.1.2.	Während der Elongation der RNA-Synthese kommt es zu sequenzspezifischem Pausieren der Polymerase, welches weder auf niedrige Nukleotidkonzentrationen noch auf Heparin zurückzuführen ist	64
3.1.3.	Rekonstituierte Pol III Transkriptionssysteme enthalten La in	67

	signifikanten Mengen	
3.1.4.	Ein rekonstituiertes Transkriptionssystem, das mit Antikörpern gegen La depletiert wird, ist transkriptionsaktiv	71
3.1.5.	Aus dem La-depletierten Transkriptionssystem sind keine La-VAI-RNA-Komplexe zu präzipitieren	73
3.1.6.	Die Menge von präzipitierbarem VAI-RNA-Komplex ist abhängig von der La-Konzentration, während sich die Transkription durch rekombinantes La nicht stimulieren lässt	75
3.1.7.	Isolierung von funktionell aktiven Transkriptionskomplexen durch Glyzeringradientenzentrifugation	77
3.1.8.	TBP als Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIB β ist Bestandteil des Transkriptionskomplexes, während La nicht mit dem Komplex assoziiert vorliegt	79
3.1.9.	TBP, das in den Transkriptionskomplex integriert ist, lässt sich von unspezifisch an die Vektor-DNA gebundenem TBP trennen	85
3.1.10.	La ist zu keiner Phase des Transkriptionszyklus mit dem Transkriptionskomplex assoziiert, während TBP stabil komplexiert bleibt	89
3.1.11.	Isolierte Transkriptionskomplexe sind reinitiationskompetent und lassen sich durch diverse Transkriptionsfaktoren, nicht aber durch La stimulieren	92
3.2.	Der Einfluss des 5' nicht-kodierenden Bereiches am 5S-Gen	96
3.2.1.	Auswirkungen von Veränderungen des 5'-Bereiches des 5S-Gens in der <i>in vitro</i> Transkription / Subklonierung der Plasmide pBEhe5S wt und pBEhe5S D-Box	96
3.2.2.	Es ist nicht möglich, im Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) D-Box-spezifische Protein-DNA-Komplexe an 5S-Fragmenten nachzuweisen	101
3.2.3.	Die Superhelikalität der Matrize ist keine Voraussetzung für die Funktion der D-Box	101
3.2.4.	Die unterschiedliche Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und D-Box-Mutante ist abhängig vom verwendeten Transkriptionssystem	103
3.2.5.	Euate von assemblierten VAI-Transkriptionskomplexen sind	107

	unterschiedlich aktiv an pBEhe5S wt und PBEhe5S DBox	
3.2.6.	Eluierte Transkriptionskomplexe von Wildtyp- und D-Box-5S-DNA-Fragmenten zeigen weitgehend identische Transkriptionseigenschaften	109
3.2.7.	Das Ausmaß der unterschiedlichen Transkriptionseffizienz zwischen D-Box-mutiertem und Wildtyp-5S-Gen ist abhängig von der TFIIIC1-Konzentration und von den Inkubationsbedingungen	111
4.	Diskussion	117
4.1.	Getrennte Analyse der Präinitiationskomplexbildung und der späteren Phasen der Pol III Transkription	119
4.2.	Isolierung und Charakterisierung humaner Transkriptionskomplexe	121
4.3	Ist La ein Pol III Transkriptionsfaktor?	124
4.4.	Die Rolle von TFIIIC1 und der anderen Transkriptionsfaktoren während der Komplexassemblierung und in späteren Phasen des Transkriptionszyklus	128
4.5.	Der Einfluss der 5'-flankierenden Sequenzen auf die Transkriptionseffizienz genintern regulierter Pol III Gene	130
4.6.	Die D-Box ist essentiell für eine effektive Transkription des humanen 5S-Gens, nicht aber für die Startpunktfestlegung der Transkription	131
4.7.	Gibt es einen eigenständigen spezifisch D-Box-bindenden Faktor?	133
4.8.	Wie wirkt die D-Box?	137
4.9.	Ausblick	140
5.	Zusammenfassung	142
6.	Abkürzungen	144
7.	Literaturverzeichnis	148
8.	Anhang	168

1. Einleitung

1.1. Transkription in der eukaryonten Zelle

Die genetische Information des Menschen ist zum größten Teil in den Chromosomen und nur zu einem geringen Teil in den Mitochondrien gespeichert. Die Speichersubstanz ist die Desoxyribonukleinsäure (DNS, DNA), deren Code die Abfolge der Basen Adenin, Cytosin, Thymin und Guanin darstellt. Ein Abschnitt der DNA, der für ein bestimmtes Produkt kodiert, wird als Gen bezeichnet. Vermutlich gibt es im menschlichen Genom ca. 100000 Gene. Um die genetische Information eines Gens abzurufen, wird die DNA-Sequenz in Ribonukleinsäure (RNS, RNA) umgeschrieben. Dieser Vorgang wird als Transkription bezeichnet und von den DNA-abhängigen RNA-Polymerasen katalysiert.

Die Mehrzahl der Gene kodieren für RNAs, die anschließend als Matrize für die Proteinbiosynthese dienen (heteronukleäre RNA, messenger RNA). Sie werden daher auch als Protein-kodierende Gene bezeichnet. Außerdem gibt es Gene, deren RNA (meist nachträglich modifiziert) bereits das Endprodukt darstellt, das in der Zelle funktionelle Aufgaben übernimmt. Hierzu gehören zum Beispiel die tRNA-Gene sowie die Gene für die ribosomalen RNAs.

Im Gegensatz zu den Eubakterien, in denen nur eine einzige RNA-Polymerase alle Gene transkribiert, gibt es in Eukaryonten drei verschiedene RNA-Polymerasen, die als Polymerasen I, II und III, bzw. A, B und C bezeichnet werden. Sie unterscheiden sich unter anderem in ihrer Sensitivität gegenüber dem Pilzgift -Amanitin (Seifart und Sekeris, 1969; Roeder und Rutter, 1969; Chambon, 1975).

Die RNA-Polymerase I transkribiert nur das 45S-rRNA-Gen, das aber in hoher Kopienzahl im Genom vorliegt. Aus der primär entstehenden 45S-RNA werden nachfolgend die ribosomalen 5,8S-, 18S- und 28S-rRNAs prozessiert (Udvardy und Seifart, 1976; Grummt, 1981; Moss und Stefanofsky, 1995).

Die RNA-Polymerase II ist verantwortlich für die Transkription aller Protein-kodierenden Gene. Die dabei entstehenden heteronukleären RNAs (hnRNA) werden nachfolgend zu messenger RNAs (mRNA) prozessiert, welche dann an den Ribosomen translatiert werden. Weiterhin transkribiert die Polymerase II auch kleinere RNAs, insbesondere die snRNAs (small nuclear RNAs) des Spleißapparates (außer der U6-RNA) (Roeder, 1996; Proudfoot, 2000; Hernandez, 1992).

Die RNA-Polymerase III katalysiert die RNA-Synthese der tRNA-Gene, des 5S-rRNA-Gens, welches ebenfalls in mehreren hundert Kopien vorliegt, des U6-Gens sowie anderer kleiner RNAs. Auch einige Viren bedienen sich der RNA-Polymerase III zur Produktion einiger ihrer RNAs.

1.2. Die RNA-Polymerase III

Bezüglich der RNA-Polymerasen der eukaryonten Lebewesen ist über die Enzyme der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* am meisten bekannt. Es wird von einer weitreichenden Übereinstimmung im Aufbau und der Funktionsweise mit den entsprechenden Polymerasen von Metazoen ausgegangen (Sentenac et al., 1992).

Alle drei RNA-Polymerasen sind aus zwei großen und mehreren kleineren Untereinheiten aufgebaut. Die RNA-Polymerase III (C) aus der Hefe (yPol III) besteht aus 17 Untereinheiten mit Größen von 10 bis 160 kDa und einem Gesamtmolekulargewicht von mehr als 650 kDa. Alle Untereinheiten konnten kloniert werden (Gabrielsen und Sentenac, 1991; Sentenac et al., 1992; Sadhale und Woychik, 1994; Ferri et al., 2000). Die beiden größten Untereinheiten (C160 und C128) sind strukturell und funktionell verwandt mit den beiden größten Untereinheiten der yPol I und yPol II sowie mit der β' - und β -Untereinheit der E. coli Polymerase. Sie sind an den basalen Funktionen wie Nukleotideinbindung und Interaktionen mit DNA und entstehender RNA beteiligt (Sentenac et al., 1992; Dieci et al., 1995). Fünf kleinere Untereinheiten sind essentieller Bestandteil aller drei Hefe-Polymerasen (Gabrielsen und Sentenac, 1991; Sentenac et al., 1992).

Die Untereinheiten yRPC82, 53, 34 und 31 sind spezifische Untereinheiten der Polymerase III. Hiervon stellen yRPC31, 34 und 82 vermutlich einen Subkomplex dar, der zur Erkennung des Präinitiationskomplexes benötigt wird (Werner et al., 1992; Werner et al., 1993; Thullier et al., 1995; Brun et al., 1997).

Die humane RNA-Polymerase III besteht aus 16 Untereinheiten (Wang und Roeder, 1996; Wang und Roeder, 1997). hRPC53 (Itmann et al., 1993) und ein Subkomplex, bestehend aus hRPC32, hRPC39 und hRPC62 konnten kloniert werden (Wang und Roeder, 1997). Dieser Subkomplex zeigt Homologien mit dem Subkomplex der yPol III und ist ebenfalls beteiligt an der Erkennung des Präinitiationskomplexes durch Interaktionen mit TFIIIB (Wang und Roeder, 1997).

1.3. Die Polymerase III abhängigen Gene, ihre Promotorstrukturen und die beteiligten Transkriptionsfaktoren

Die Gene, die von der Polymerase III transkribiert werden, kodieren für RNAs, die funktionelle Aufgaben in der Zelle wahrnehmen, ohne translatiert zu werden. Daher sind diese Gene weitaus kürzer als die Protein-kodierenden Pol II-Gene. Es können zwei Typen von Pol III Genen unterschieden werden:

- Die „klassischen Gene“ zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Promotorelemente innerhalb des kodierenden Bereiches des Gens liegen. Innerhalb dieser Gruppe hat das 5S-rRNA-Gen eine Sonderstellung („AC“-Typ), da es eine andere Promotorstruktur aufweist als die anderen klassischen Gene („AB“-Typ).
- Die „5'-regulierten“ Gene tragen im Gegensatz zu den „klassischen“ Genen alle Promotorelemente außerhalb des kodierenden Bereiches und ähneln in ihrem Aufbau den Pol II abhängigen Genen.

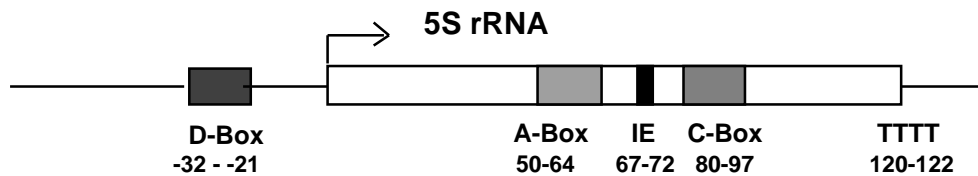
1.3.1. tRNA-Gene, VAI- und VAIL- sowie andere Gene mit AB-Typ Promotor

Zu den Genen mit AB-Typ Promotoren zählen die tRNA-Gene, die adenoviralen VAI- und VAIL-Gene sowie die hochrepetitiven Alu-Elemente. Der Promotor dieser Gene ist vollständig in der kodierenden Sequenz lokalisiert und besteht aus zwei konservierten Elementen, der A-Box und der B-Box (Fowlkes und Schenk, 1980; Guilfoyle und Weinmann 1981; Hofstetter et al., 1981; Rosa et al., 1981; Geiduschek und Tocchini-Valentini, 1988; Geiduschek und Kassavetis, 1992). Im Gegensatz zum 5S-Gen ist die Basenabfolge der dazwischenliegenden Sequenz beliebig (Cannon et al., 1986). Während die B-Box die Zielsequenz für den primär DNA bindenden Faktor TFIIC (TFIIC2) darstellt, legt die A-Box den Ort der Initiation fest, welche zwischen 13 und 18 Basenpaare (Bp) stromaufwärts erfolgt (Ciliberto et al., 1983; Baker et al., 1987; Cannon et al., 1986; Geiduschek und Kassavetis, 1992). Der Abstand zwischen beiden Elementen beim Hefe-tRNA-Gen beträgt im günstigsten Fall zwischen 30 und 60 Basenpaare, allerdings kann auch bei Abständen zwischen 14 und 300 Basenpaaren *in vitro* eine Transkription erzielt werden (Baker et al., 1987; Fabrizio et al., 1987). Auch der Abstand der A-Box zur B-Box beim VAI-Gen kann variiert werden (Cannon et al., 1996). Zu große oder zu kleine Abstände führen zu

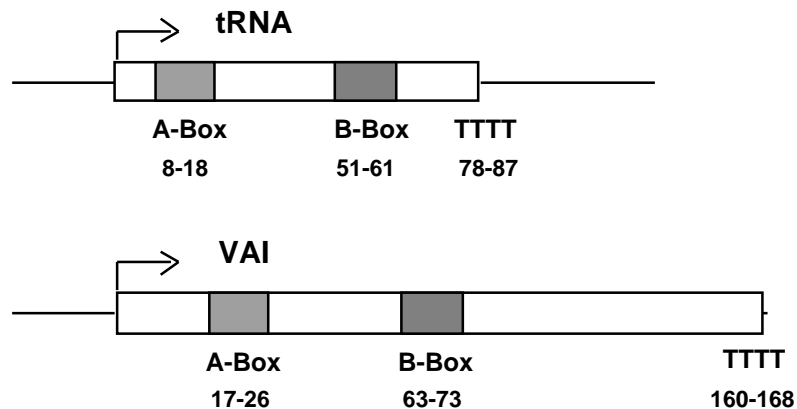
einer fehlerhaften Startpunktfestlegung (Cannon et al., 1986; Baker et al., 1987; Fabrizio et al., 1987).

Übersicht 1: Die verschiedenen Pol III Gene und ihre Promotorstrukturen

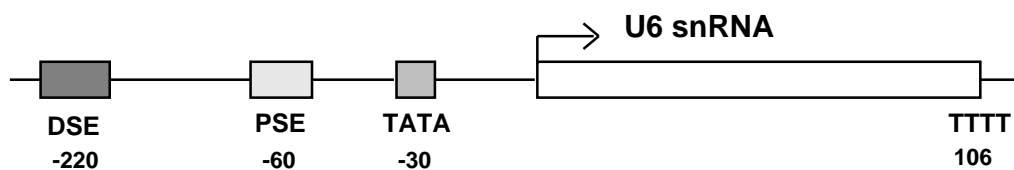
Typ 1 (AC-Typ): 5S-rRNA Gen



Typ 2 (AB-Typ): tRNA-Gene, Adenovirale Gene, ALU-Sequenzen



Typ 3 (5'-regulierte Promotoren): U6 -Gen, 7SK-Gen



Zusätzlich zu den intragenischen Elementen konnte weiterhin gezeigt werden, dass Punktmutationen im Bereich des VAI-Gens von Bp -30 bis +1 zum Teil drastische Effekte auf die Promotorstärke hervorrufen (Wu et al., 1987).

Bereits 1980 wurde festgestellt, dass die Phosphocellulosefraktionen PCB und PCC aus zytoplasmatischem Extrakt ausreichend sind, um eine Transkription am tRNA-Gen zu rekonstituieren. Die RNA-Polymerase III ist in beiden Fraktionen enthalten, so dass es offensichtlich war, dass mindestens zwei zusätzliche Aktivitäten benötigt werden (Segall et al., 1980). Daher wurde die in der PCB enthaltene Aktivität TFIIIB und die Aktivität in der PCC TFIIIC genannt. 1987 konnte die TFIIIC-Aktivität über MonoQ Chromatographie in die zwei Komplexe TFIIIC1 und TFIIIC2 getrennt werden (Yoshinaga et al., 1987; Dean und Berk, 1987). Beide Aktivitäten werden für alle genintern regulierten Gene benötigt. TFIIIC2 ist der primär DNA-bindende Transkriptionsfaktor an den AB-Typ-Genen. Die B-Box stellt die spezifische Erkennungssequenz für diesen Faktor dar (Yoshinaga et al., 1987).

Der dritte Transkriptionsfaktor, der für die Transkription der AB-Typ-Gene benötigt wird, ist TFIIIB. Im Gegensatz zur Hefe, in der nur eine Form dieses Faktors existiert, konnten im Menschen zwei Formen identifiziert werden (TFIIIB und TFIIIB β). Alle klassischen Gene benötigen TFIIIB β für die Transkription (Teichmann und Seifart, 1995)

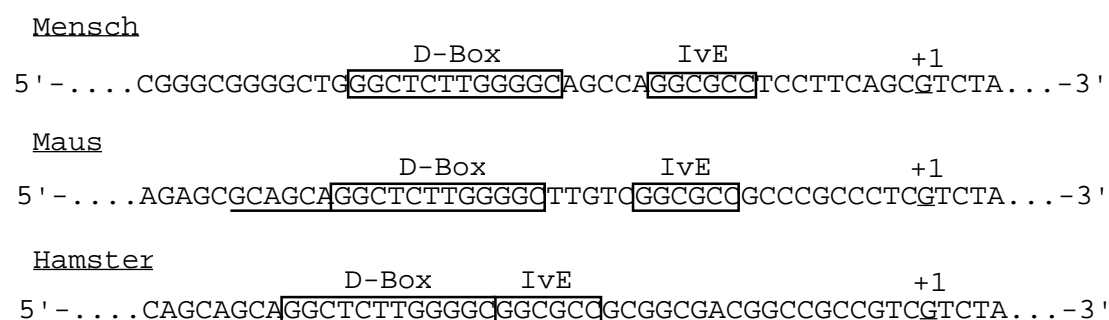
1.3.2. Das 5S-rRNA-Gen (AC-Typ)

Der Promotor des 5S-Gens ist ebenfalls in mehrere Einheiten aufgespalten und wird in seiner Gesamtheit als Internal Control Region (ICR) bezeichnet. Diese umspannt den Bereich von Bp +50 bis +97 und besteht aus einer A-Box (Bp +50 bis +64), dem intermediären Element (IE) (Bp +67 bis +72) sowie der C-Box (Bp +80 bis +97) (Sakonju et al., 1980; Bogenhagen et al., 1980; Pieler et al., 1985a; Pieler et al., 1985b; Pieler et al., 1987). Die ersten 10 Basenpaare der A-Box des 5S-Gens entsprechen der Consensussequenz der tRNA A-Box, und ihre Funktion ist ebenfalls die Startpunktfestlegung der Transkription, die in diesem Falle aber 50 Basenpaare stromaufwärts erfolgt (Ciliberto et al., 1983). Die gesamte ICR ist die Bindungsregion für den genspezifischen Transkriptionsfaktor TFIIIA (Engelke et al., 1980; Miller et al., 1985; Seifart et al., 1989). Der Abstand zwischen den drei Promotorelementen ist

essentiell für eine effiziente TFIIIA-Bindung und Transkription (Miller et al., 1985; Pieler et al., 1987).

Auch für die Transkription des 5S-Gens werden neben TFIIIA die Transkriptionsfaktoren IIIC1, IIIC2 und IIIB β benötigt. Allerdings erfolgt in diesem Fall die Einbindung von TFIIIC2 durch Wechselwirkung mit TFIIIA (Oettel et al., 1997).

Übersicht 2: Vergleich der 5'-flankierenden Sequenzen der 5S-rRNA-Gene von Mensch, Maus und Hamster (nach Hallenberg et al., 1994)



IvE: Invariables Element

GCAGCA: erweiterte Homologie der D-Box zwischen Maus und Hamster

Im Menschen gibt es mehrere hundert Kopien des 5S-Gens und zusätzlich eine ganze Reihe von Pseudogenen und Genvarianten, wobei letztere *in vitro* transkribiert werden können, es aber unklar ist, ob sie *in vivo* exprimiert werden (Sørensen, et al., 1990; Sørensen und Frederiksen, 1991; Nielsen et al., 1993). Die kodierende Region des humanen 5S-Gens ist im Vergleich mit anderen Säugern und auch den Amphibien hochkonserviert. Hingegen zeigt sich im 5'-Bereich stromaufwärts des Startpunktes eine größere Variabilität (siehe Übersicht 2). Der Cytosinrest in Position -1 ist hoch konserviert zwischen Pflanzen, Fröschen, Hefe, Drosophila und Säugern (Hallenberg et al., 1994). Eine mögliche SP1-Bindungsstelle bei Bp -43 bis -38 ist nicht auf allen klonierten Kopien des h5S-Gens erhalten (Nielsen et al., 1993). Auch das Maus-Gen und das Hamster-Gen tragen eine bzw. zwei mögliche SP1- Erkennungssequenzen. Für das humane 5S-Gen zeigen SP1 bzw. die mögliche SP1-Bindesequenz *in vitro* keine Funktion (Nielsen et al., 1993; Frauke Härtel, 1995; pers. Mitteilung: Wolfgang Meißner).

Im Bereich von Bp -32 bis -21 des humanen 5S-Gens findet sich eine Sequenz, die auch in Hamster und Maus enthalten, hier aber um einige Basen verschoben ist (Nielsen et al., 1993; Hallenberg et al., 1994). Die Deletion dieser Sequenz, die als D-Box bezeichnet wird, führt zu einer massiven Verminderung der Transkriptionseffizienz (Nielsen et al., 1993; Härtel, 1995). Zwischen Maus und Hamster ist die Homologie der D-Box noch einmal um 6 Basen stromaufwärts erweitert (Hallenberg et al., 1994). Bisher konnte weder eine spezifische Bindung eines Proteins an dieses Element noch ein D-Box abhängiger transkriptionsaktiver Faktor nachgewiesen werden.

1.3.3. Gene mit 5'-gelegenen Promotoren

Die Gene dieser Gruppe unterscheiden sich signifikant von den bisher beschriebenen klassischen Genen sowohl in Hinsicht auf ihre Promotorstruktur als auch auf den Faktorbedarf für die RNA-Synthese. Es handelt sich um Gene, die für verschiedene kleine RNAs kodieren, die zumeist RNA-prozessierende Aufgaben haben (Hernandez, 1992). Ein Teil der Gene dieser Gruppe werden von der RNA-Polymerase II, der andere Teil von der Polymerase III transkribiert. Zu den Pol III abhängigen Genen gehören neben dem am besten charakterisierten U6-Gen, dessen RNA Bestandteil der „small nuclear ribonucleotide protein particles“ (snrp) ist, die Gene für die humane 7SK, Y1, Y3 und H1 RNA (Hernandez, 1992).

Alle Promotorelemente des U6-Gens liegen stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription. Der primär DNA-bindende Transkriptionsfaktor ist PBP (PSE bindendes Protein), der an das bei Bp -70 liegende PSE Element (proximal sequence element) bindet (Waldschmidt et al., 1991). Außerdem bindet TBP, das hier nicht Bestandteil eines TBP-TAF-Komplex ist, an die TATA-Box, die bei Bp -25 gelegen ist. Das Vorhandensein der TATA-Box ist die Determinante für die Zugehörigkeit zu den Pol III Genen. (Hernandez, 1992).

Neben PBP wurden zwei weitere PSE-bindende Proteinkomplexe beschrieben, die als PTF und SnapC bezeichnet wurden (Murphy et al., 1992; Sadowski et al., 1993; Henry et al., 1995). Es ist zu vermuten, dass diese beiden Aktivitäten mit PBP identisch sind. Ferner wird der TBP-freie TFIIB (Teichmann und Seifart, 1995) und die neu beschriebene Aktivität TFIIU (Oettel et al., 1998) für eine effiziente U6-Transkription benötigt. Wie bereits erwähnt, kommt TFIIIC1 eine Sonderstellung

unter den humanen Transkriptionsfaktoren zu, da er als einziger Faktor an der Transkription aller Typen von Pol III Genen beteiligt ist (Yoon et al., 1995; Oettel et al., 1998).

Ferner wirkt ein als Enhancer fungierendes DSE-Element (distal sequence element) stimulierend auf die Transkription. Es enthält Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SP1 und Oct-1 (Hernandez, 1992).

1.4. Die Transkriptionsfaktoren der klassischen Pol III Gene

1.4.1. TFIIC

Der Transkriptionsfaktor TFIIC der Hefe, yTFIIC (auch als β bezeichnet), wird für die Transkription aller Pol III Gene benötigt und ist der primär bindende Proteinkomplex bei der tRNA-Transkription. yTFIIC ist ein Multiproteinkomplex aus 6 Proteinen mit Molekulargewichten von 138, 131, 95, 91, 60 und 55 kDa (Gabrielsen et al., 1989; Schultz et al., 1989; Bartholomew et al., 1990; Parsons und Weil, 1990; Conesa et al., 1993). Er weist eine zweigeteilte Struktur aus zwei großen Domänen auf, die als A und B bezeichnet werden. B zeigt starke Interaktionen mit der B-Box des tRNA Promotors, während die A Domäne mit der A-Box interagiert. Die DNA-bindenden Untereinheiten beider Teilkomplexe sind 138 (B) und 95 (A). Crosslink-Untersuchungen zeigten, dass 131 die Untereinheit des β -Komplexes (A) ist, welche als einzige Interaktionen mit der DNA bis in den Bereich des Startpunkts der Transkription aufweist (Bartholomew et al., 1990; Bartholomew et al., 1991). Über diese Untereinheit wird TFIIB vermutlich in den Transkriptionskomplex integriert (Khoo et al., 1994; Chaussivert et al., 1995; R  th et al., 1996).

Alle Untereinheiten von yTFIIC konnten kloniert werden (Swanson et al., 1991; Lefebvre et al., 1992; Marck et al., 1993; Parsons und Weil, 1992; Arrebola et al., 1998; Manaud et al., 1998). Obwohl eine partielle Proteolyse des β -Komplexes zur Trennung von A und B führt (Marzouki et al., 1986), konnte noch nie eine chromatographische Trennung der beiden Teilkomplexe beobachtet werden.

hTFIIC2 ist der primär DNA-bindende Komplex an den Genen des AB-Typs im humanen System. TFIIC2 ist ein Multiproteinkomplex aus 5 Untereinheiten von 220, 110, 102, 90 und 63 kDa Größe (Yoshinaga et al., 1989; Kovelman und Roeder, 1992). Alle Untereinheiten von TFIIC2 liegen inzwischen kloniert vor (L'Etoile et al.,

1994; Lagna et al., 1994; Sinn et al., 1995; Hsieh et al., 1999a; Hsieh et al., 1999b). Die größte Untereinheit (TFIIIC220) ist die primär an die B-Box bindende Komponente des Komplexes.

Mit TFIIIC1 existiert im Menschen neben TFIIIC2 eine weitere „C-Komponente“, die chromatographisch von TFIIIC2 abgetrennt werden kann (Yoshinaga et al., 1987; Dean und Berk, 1987). Zunächst wurde mittels DNaseI-„Footprints“ beschrieben, dass TFIIIC2 alleine am VAI-Gen nur den Bereich der B-Box von Bp +42 bis +80 abdeckt und dass dieser Schutz durch Eintreten von TFIIIC1 in den Komplex bis zum Initiator erweitert wird (Yoshinaga et al., 1987; Dean und Berk, 1987). Es konnte in diesen Untersuchungen aber nicht geklärt werden, ob TFIIIC1 selbst mit der DNA in Interaktion tritt oder ob diese TFIIIC1-abhängige Erweiterung auf einer Konformationsänderung von TFIIIC2 beruht. Neuere Daten zeigen, dass TFIIIC1 die Bindung von TFIIIC2 an Genen des AB-Typs sowie die Bindung von TFIIIA und PBP am 5S- bzw. U6-Gen verstärkt (Oettel et al., 1997; Wang und Roeder, 1996). Außerdem zeigte sich, dass TFIIIC2 in hohen Konzentrationen auch ohne TFIIIC1 in der Lage ist, die gesamte Promotorregion von der B-Box bis zum Startpunkt abzudecken (Oettel et al., 1997).

TFIIIC2 scheint aber nicht einfach der homologe Proteinkomplex zu sein, denn keine der beiden größten Untereinheiten hTFIIIC220 und hTFIIIC110 zeigen Sequenzhomologien zu einer der sechs Untereinheiten von yTFIIIC. Hingegen konnten Sequenzhomologien zwischen hTFIIIC63 und 95 sowie zwischen hTFIIIC102 und 131 gefunden werden (Hsieh et al., 1999a). Tatsächlich wurden Interaktionen von hTFIIIC102 mit TBP und TFIIIB90, zwei Untereinheiten des humanen TFIIIB- (TFIIIB β)-Komplexes, nachgewiesen. Daher wurde postuliert, dass hTFIIIC102, ähnlich wie dem homologen Polypeptid in der Hefe, eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von TFIIIB in den Initiationskomplex zukommt (Hsieh et al., 1999a).

Für TFIIIC2 wurde eine transkriptionsaktive und eine -inaktive Form beschrieben, die sich in ihrer Untereinheitenzusammensetzung unterscheiden. Der inaktive TFIIIC2b enthält statt des 110 kDa Proteins des aktiven TFIIIC2a ein 77 kDa Protein. Schnell wachsende und adenoinfizierte Zellen weisen mehr 110 kDa Protein und dadurch mehr aktives TFIIICa auf (Hoeffler, 1988; Kovelmann und Roeder, 1992).

Die Untereinheitenstruktur von TFIIIC1 ist noch unbekannt. Bisher konnte dieser Faktor nicht bis zur Homogenität gereinigt werden. Allerdings gelang es, mittels

Immunodepletion gegen TFIIIC220 einen Komplex zu isolieren, der als „Holo-TFIIIC“ bezeichnet wurde (Wang und Roeder, 1998). Dem TFIIIC1-Anteil dieses Komplexes wurden Polypeptide mit Molekulargewichten von 70, 50, 45 und 40 kDa zugeschrieben. Dies stimmt gut mit einer Größenabschätzung von TFIIIC1 mittels eines Sucrosegredienten überein, die einen 200 kDa Komplex erwarten ließ (Yoshinaga et al., 1987). Ferner sollen dem „Holo-TFIIIC“ zwei weitere Komponenten zugeordnet sein, PC4 und die DNA-Topoisomerase I. Für eine effiziente VAI-Transkription soll mindestens einer dieser Faktoren benötigt werden (Wang und Roeder, 1998).

Während TFIIIC2 nur an klassischen Genen, nicht aber am 5'-regulierten U6-Gen benötigt wird, ist TFIIIC1 essentiell für alle Pol III Gene (Lagna et al., 1994; Yoon et al., 1995; Oettel et al., 1997). Vermutlich stellt er sogar den limitierenden Faktor der Pol III Transkription dar (Yoshinaga et al., 1987; Härtel, 1999; Thomae, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass TFIIIC1 unter bestimmten Bedingungen eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung der Polymerase III zum Initiator zukommt (Kober et al., 1998, siehe 1.5.2.). Außerdem ist er vermutlich ein zentraler Angriffspunkt der Transkriptionsregulation während des Zellzyklus und bei der Zelldifferenzierung (Härtel, 1999; Thomae, 2000).

Neben TFIIIC1 konnten weitere ähnliche Aktivitäten entdeckt werden. So wurde beschrieben, dass von der Phosphocellulose bei 280 mM KCl eine Aktivität eluiert, die funktionell mit TFIIIC1 austauschbar ist und daher als TFIIIC1' bezeichnet wurde (Wang und Roeder, 1996). Auch in unserem Labor konnte in einigen PCB-Präparationen eine C1-Aktivität gefunden werden (Thomae, 2000). Außerdem wurde eine weitere Aktivität in der PCC identifiziert, die bei einer niedrigeren KCl-Konzentration von der MonoQ eluiert und daher zunächst als TFIIIC0 bezeichnet wurde (Oettel et al., 1997). Weitere chromatographische Reinigungen zeigten, dass in dieser Fraktion aber drei verschiedene Aktivitäten enthalten sind, die TFIIIC1 ähnliche Aktivität TFIIIC1_{like}, die TFIIIC1 an allen Pol III Genen partiell ersetzen kann, eine Aktivität, die für 5'-regulierte Gene benötigt wird (TFIIIU), sowie eine Aktivität, die einen DNase-Schutz über dem Terminatorbereich verschiedener Pol III Gene zeigt (Terminator bindende Aktivität, TBA) (Oettel et al., 1998). Interessanterweise wird von Wang und Roeder (1996) die terminationsbindende Aktivität als Untereinheit von TFIIIC1 angesehen.

1.4.2. TFIIB

Der Aufbau und die Funktion des Transkriptionsfaktors IIB ist in der Hefe bereits weitgehend aufgeklärt. TFIIB wird für die Transkription aller Pol III Gene benötigt. yTFIIB kann chromatographisch in zwei Fraktionen aufgetrennt werden, B' und B''. B' besteht aus dem 70 kDa großen TFIIB70 und TBP, die B'' Fraktion aus dem 90 kDa großen B''₉₀ (yTFIIB90) sowie vermutlich der bisher wenig charakterisierten Aktivität TFIIE (Bartholomew et al., 1991; Kassavetis et al., 1991; Huet und Sentenac, 1992; Kassavetis et al., 1992; Dieci et al., 1993; R  th et al., 1996). Die Gene für TFIIB70 und TFIIB90 konnten kloniert werden (L  pez-De-Le  n et al., 1992; Buratowski und Zhou 1992; Colbert und Hahn, 1992; Kassavetis et al., 1995; R  th et al., 1996; Roberts et al., 1996). Die TFIIB-Aktivität kann durch sequenzielle Anlagerung der Komponenten in den Präinitiationskomplex rekonstituiert werden (Kassavetis et al., 1992a).

yTFIIB wird in den Komplex durch Interaktion von TFIIB70 und B''₉₀ mit der yTFIIIC-Untereinheit 131 eingebaut (Bartholomew et al., 1991; Khoo et al., 1994; Chaussivert et al., 1995; R  th et al., 1996). Seine Funktion ist die Rekrutierung der Polymerase in den Transkriptionskomplex (Kassavetis et al., 1990).

Auch der humane Transkriptionsfaktor TFIIB wurde zunächst als der Transkriptionsfaktor des Pol III Transkriptionssystems identifiziert, der analog zu TFIID und SL1 (TIFIB) TBP enthält und somit als TBP-TAF-Komplex definiert wird. Die TFIIB zugehörigen TAFs konnten bisher aber noch nicht vollständig identifiziert werden. So wurden Proteine von 150, 82 und 54 kDa (Lobo et al., 1992), 190, 96, 87 und 60 kDa (Chiang et al., 1993) sowie 172kDa (Taggart et al., 1992) der TFIIB-Aktivität zugeschrieben.

Nur ein humaner TAF konnte bisher sicher identifiziert und kloniert werden. hTAF 90 zeigt deutliche Homologien zu yTFIIB70 und ebenso wie dieser Homologien zu dem Pol II Transkriptionsfaktor TFIIB (Wang und Roeder, 1995).

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass zwei Unterformen von TFIIB existieren, die durch EDF-Chromatographie der PCB Fraktion voneinander abgetrennt werden können. TFIIB ist ein TBP-freier Komplex und kann nach Supplementation mit freiem TBP die Transkription am U6-Gen rekonstituieren. TFIIB   hingegen ist ein TBP-haltiger Komplex, der an genintern regulierten Promotoren aktiv ist (Teichmann

und Seifart, 1995). Der klonierte TAF 90 ist nur Bestandteil des TFIIIB β -Komplexes (Teichmann et al., 1997; Kober et al., 1998).

Interessanterweise ist γ TFIIIB nicht in der Lage, TFIIIB β in der tRNA-Transkription funktionell zu ersetzen, wohl aber TFIIIB am U6-Gen. Ebenso konnte eine teilgereinigte B'' Fraktion (B''₉₀ + TFIIIE), nicht aber γ B''₉₀ alleine die U6-Transkription rekonstituieren (Teichmann et al., 1997).

Auch der humane TFIIIB konnte in zwei Teilaktivitäten aufgetrennt werden, von denen eine Teilaktivität Kreuzreaktivitäten mit Antikörpern gegen γ B''₉₀ zeigte und auch durch diesen funktionell ersetzt werden konnte. Dieser Fraktion wurden Polypeptide von 65, 67 und 90 kDa zugeordnet. Das 90 kDa Protein zeigte aber keine Kreuzreaktivität mit TAF 90 (TFIIIB90) (Teichmann et al., 1997).

Zwar ist TFIIIB wohl auch im Menschen der zentrale Initiationsfaktor und weist starke Interaktionen zu Untereinheiten der Polymerase auf (Wang und Roeder, 1997), aber vermutlich werden auch andere Faktoren zur Rekrutierung der Polymerase in den Präinitiationskomplex benötigt (siehe 1.4.2.).

1.4.3. TFIIIA

TFIIIA ist ein genspezifischer Transkriptionsfaktor, der an die ICR des 5S-rRNA-Gens bindet und somit den Aufbau des Transkriptionskomplexes initiiert (Engelke et al., 1980; Pelham und Brown, 1980; Bogenhagen et al., 1980; Lassar et al., 1983; Bieker et al., 1985). TFIIIA agiert in den frühen Phasen der Oozytenreifung in Amphibien aber nicht nur als Transkriptionsfaktor, sondern komplexiert nach der Transkription mit der neusynthetisierten RNA zum „cytoplasmic 7S storage particle“ (Picard und Wegnez, 1979; Honda und Roeder, 1980; Pelham und Brown, 1980). Da eine große Anzahl dieser Komplexe in den Eiern gespeichert ist, ist X./TFIIIA der erste Transkriptionsfaktor überhaupt, dessen cDNA kloniert werden konnte (Ginsberg et al., 1984). Sein Molekulargewicht beträgt 38 kDa. Seine Aminosäuresequenz weist neun Zinkfinger motive auf, die für die Bindung an die ICR verantwortlich sind und den größten Teil des Proteins ausmachen. Jeder Finger besteht aus 30 Aminosäuren mit je zwei paarweise angeordneten Cystein- und Histidinresten, die mit je einem Zinkatom komplexieren. Der C-Terminus des Proteins ist zum Transkriptionsstart hin, der (sehr kurze) N-Terminus zum Terminator orientiert (Miller et al., 1985). Obwohl jeder einzelne Zinkfinger zur Bindung an die ICR beiträgt, besitzen die drei

aminoterminalen Zinkfinger den größten Bindungsanteil, während die drei C-terminalen Finger wichtig für die Transkriptionsaktivität von TFIIIA sind (Miller et al., 1985; Vrana et al., 1988; Liao et al., 1992; Del Rio und Setzer, 1993). Ebenfalls essentiell für die Transkriptionsaktivität von TFIIIA ist eine Transaktivierungsdomäne im C-Terminus, welche nicht selbst an die DNA bindet (Smith et al., 1984; Vrana et al., 1988; Mao und Darby, 1993).

TFIIIA aus *Saccharomyces cerevisiae* ist 50 kDa groß und trägt ebenfalls neun Zinkfinger. Seine Aminosäuresequenz zeigt aber nur eine geringe Homologie zu *X.l.*TFIIIA (Archambault et al., 1992).

Der humane Transkriptionsfaktor TFIIIA (hTFIIIA) überspannt sehr ähnlich wie *X.l.*TFIIIA die komplette ICR des 5S-Gens im Bereich von Bp +43 bis +97 (Seifart et al., 1989; Moorefield und Roeder, 1994). hTFIIIA ist mit 42 kDa etwas größer und zeigt Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen *X.l.*TFIIIA (Moorefield und Roeder, 1994). Inzwischen konnte auch die cDNA für humanes TFIIIA isoliert werden. hTFIIIA weist demnach 58% Homologie zu *X.l.*TFIIIA auf (Arakawa et al., 1995; Drew et al., 1995).

Im Falle des 5S-Gens führt der Einbau von TFIIIC2 zu einer Erweiterung des TFIIIA Footprints über die ICR hinaus bis in den Startbereich des 5S-Gens (Fradkin et al., 1989; Oettel et al., 1997).

1.5. Der Polymerase III Transkriptionskomplex

1.5.1. Die sequenzielle Anlagerung der Transkriptionsfaktoren an den Promotor

Das Grundschema des Aufbaus eines humanen Transkriptionskomplexes an den verschiedenen Pol III Genen ist, abgesehen von den unterschiedlichen Promotorstrukturen und den beteiligten Faktoren, recht ähnlich. Es beginnt mit der Anlagerung eines primär DNA-bindenden Transkriptionsfaktors an eine für ihn spezifische Erkennungssequenz auf der DNA. Im Falle des VAI-Gens übernimmt diese Funktion TFIIIC2, am 5S-Gen bindet TFIIIA und am U6-Gen PBP (siehe 1.3.). Alle weiteren Transkriptionsfaktoren werden in sequenzieller Abfolge in den Komplex eingebaut (Lassar et al., 1983; Bieker et al., 1985; Dean und Berk, 1988; Oettel et al., 1997).

Während die Bindung von TFIIIC(2) an die B-Box von Typ-AB-Genen bzw. die Bindung von TFIIIA und nachfolgend TFIIIC(2) an die ICR des 5S-Gens vergleichsweise schnelle Prozesse sind, stellen die Einbindung von TFIIIB und die Rekrutierung der Polymerase die zeitlimitierenden Vorgänge bei der Ausbildung des kompletten Transkriptionskomplexes dar (Bieker et al., 1985). Der genaue Mechanismus der TFIIIB(β)-Einbindung in den Transkriptionskomplex der klassischen Gene ist im humanen System noch wenig untersucht. Zwar zeigen neuere Daten, dass die TFIIIC2-Untereinheiten TFIIIC102 und TFIIIC63 mit TFIIIB90 und TBP interagieren und außerdem TFIIIC102 mit TBP sowie TFIIIC90 mit TFIIIB90 in Kontakt treten (Hsieh et al., 1999a; Hsieh et al., 1999b), allerdings konnte bisher keine Erweiterung des TFIIIA-TFIIIC2 Footprints am 5S-Gen bzw. des TFIIIC2-Footprints an Typ-AB-Genen durch TFIIIB(β) gezeigt werden. Unklar ist daher, in welchen Regionen des Gens TFIIIB(β) bindet.

Die Einbindung von yTFIIIB in den Transkriptionskomplex der Hefe ist hingegen bereits gut erforscht. yTFIIIB ist alleine nicht in der Lage, spezifisch die Promotor-DNA zu erkennen und mit ihr zu komplexieren. Durch die Interaktion mit yTFIIIC wird er zu seinem Zielort dirigiert und an der DNA verankert (siehe 1.4.2.). Der durch den TFIIIC-TFIIIB-Komplex geschützte Bereich der DNA wird dabei am tRNA und am 5S-Gen in den 5'-flankierenden Bereich bis ca. Bp -40 erweitert, während sich der direkte Bereich des Initiators hypersensitiv für DNaseI zeigt und somit Interaktionen mit der Polymerase zur Verfügung steht (Kassavetis et al., 1989; Braun et al., 1989; Kassavetis et al., 1990). Cross-Links der Untereinheiten TFIIIB70 und TFIIIB90 sowie TBP mit der DNA sind ebenfalls bis ca. Bp -40 zu beobachten (Bartholomew et al., 1991; Persinger et al., 1999).

1.5.2. Einbindung der RNA-Polymerase in den Präinitiationskomplex und Initiation der RNA-Synthese

Die Rekrutierung der Polymerase ist der letzte Schritt beim sequenziellen Aufbau des Transkriptionskomplexes (Bieker et al., 1985; Kassavetis et al., 1990). In der Hefe ist es möglich, durch Einwirkung von Heparin auf den Transkriptionskomplex yTFIIIC und yTFIIIA von der DNA zu entfernen, während yTFIIIB fest assembliert bleibt. Da dieser verbleibende Komplex alleine in der Lage ist, multiple Transkriptionsrunden zu initiieren, wird TFIIIB in der Hefe als alleiniger Initiationsfaktor angesehen

(Kassavetis et al., 1990). Genauere Analysen haben ergeben, dass die Einbindung der Polymerase in den Präinitiationskomplex durch Interaktionen von TFIIIB70 mit der Polymerase-Untereinheit γ RPC 34 erfolgt (Werner et al., 1993; Khoo et al., 1994; Brun et al., 1997; Andrau et al., 1999), welche zu einem Subkomplex gehört, der für die Erkennung des Präinitiationskomplexes benötigt wird (siehe 1.2). Ferner interagiert TFIIIB70 auch mit γ RPC17 (Ferri et al., 2000).

Die Rekrutierung der Polymerase in den Transkriptionskomplex scheint im humanen System weitaus komplexer zu sein als in der Hefe. Auch aus der humanen Polymerase kann ein homologer Subkomplex abgespalten werden, der für die Erkennung des Präinitiationskomplexes benötigt wird (siehe 1.2.). Dieser Subkomplex tritt in Kontakt mit TFIIIB durch Interaktionen von hRPC 39 (der homologen Untereinheit zu γ RPC34) mit hTFIIIB90 und TBP (Wang und Roeder, 1997). Daher ist es wahrscheinlich, dass auch im humanen System TFIIIB als Hauptinitiationsfaktor agiert.

Offensichtlich reicht der humane Faktor TFIIIB(β) alleine aber nicht für die Einbindung der Polymerase aus, da entsprechende Experimente nicht erfolgreich waren (Wang und Roeder, 1997; Kober et al., 1998). Zudem konnten mehrere Interaktionen von TFIIIC2-Untereinheiten mit dem Subkomplex der Polymerase nachgewiesen werden (Hsieh et al., 1999a; Hsieh et al., 1999b). Kober et al. 1998 demonstrierten, dass es *in vitro* möglich ist, durch Vorinkubation von TFIIIB β mit dem Histon-H5-Gen dieses Gen durch die Pol III zu transkribieren. TFIIIB β wurde in diesen Experimenten durch direkte Interaktion mit der TATA-Box an den Promotor gebunden. Interessanterweise erfolgte die Transkription nur in Anwesenheit von TFIIIC1, während TFIIIC2 nicht benötigt wurde, sondern die Transkription sogar inhibierte. Somit ist eine essentielle Rolle von TFIIIC1 bei der Polymeraserekrutierung und / oder der Initiation der RNA-Synthese wahrscheinlich (Kober et al., 1998).

Für die Hefe und für höhere Eukaryoten konnte gezeigt werden, dass durch die Rekrutierung der Polymerase ein vollständiger Protein-DNA-Komplex ausgebildet wird, der auch als „binärer“, geschlossener („closed“) Transkriptionskomplex bezeichnet wird (Bieker et al., 1985; Kassavetis et al., 1990; Kovelmann und Roeder, 1990; Kassavetis et al., 1992b). Durch Aufschmelzen der DNA durch die Polymerase im Bereich um den Startpunkt entsteht reversibel ein „open complex“. Der aufgeschmolzene Bereich umfasst am tRNA-Gen in *S. cerevisiae* ca. 20 Nukleotide

(Kassavetis et al., 1992b). Dieser Komplex kann durch den Beginn der RNA-Synthese nach einigen Nukleotiden irreversibel in einen „ternären“ Protein-DNA-RNA-Komplex überführt werden. Dieser ternäre Komplex ist stabil und bleibt auch unter Einfluss von hohen Konzentrationen von Heparin, Salz oder Sarkosyl elongationskompetent (Kovelman und Roeder, 1990; Kassavetis et al., 1992b; Geiduschek und Kassavetis, 1992).

1.5.3. Elongation der RNA und Termination der Transkription

Nachdem der „open complex“ nach der Initiation der RNA-Synthese irreversibel in den „ternären“ Protein-DNA-RNA-Komplex übergegangen ist, wird die RNA verlängert, bis die Polymerase den Terminator erreicht. Dort wird die Synthese beendet, die RNA wird aus dem Komplex entlassen und die Polymerase dissoziiert von der Matrize.

Weitestgehend unklar ist, ob die stromabwärts vom Initiator gebundenen Transkriptionsfaktoren für die Polymerase Hindernisse darstellen und ob sie während der Passage der Polymerase von der DNA abgelöst werden. In der Hefe konnte gezeigt werden, dass das Aufeinandertreffen der Polymerase und TFIIC quasi keine Verzögerung der Synthesegeschwindigkeit hervorruft, sofern TFIIC in der korrekten Orientierung an die DNA gebunden ist. Vermutlich löst die Polymerase γ TFIIC dabei von der DNA ab (Matsuzaki et al., 1994; Bardeleben et al., 1994).

Trotzdem gibt es in den Pol III Genen der Hefe eine ganze Reihe von Orten, an denen die Polymerase während der Synthese pausiert (Steinberg und Burgess, 1992; Matsuzaki et al., 1994; Bardeleben et al., 1994; Shaaban et al., 1996). An diesen „Pausing Sites“ kann, nach einem allgemeinen Modell für alle RNA-Polymerasen, das katalytische Zentrum den Kontakt zum 3'-Ende der RNA verlieren und wird dadurch arretiert. Durch eine intrinsische 3' 5'-Nukleaseaktivität kann sich die Polymerase aber aus diesem Arrest wieder befreien und seine Synthese weiter fortsetzen (Izban und Luse, 1992; Rudd et al., 1994; Reines, 1992; Whitehall et al., 1994; Reines et al., 1996; Thuillier et al., 1996; Chédin et al., 1998). Es ist davon auszugehen, dass im Falle des Pol III Systems ein größerer Teil dieser „Pausing Sites“ nicht auf Protein-Hindernisse zurückzuführen ist, sondern auf intrinsische Pausierungssignale der DNA. Diese Pausierungen kontrollieren die Geschwindigkeit der RNA-Synthese und werden von der Polymerase benötigt, um das

Terminationssignal zu erkennen und die Synthese zu beenden (Shaaban et al., 1996; Bobkova und Hall, 1997; Chedin et al., 1998).

Der Terminator eines Pol III Gens besteht aus einer Abfolge von mindestens vier (in der Hefe fünf) Thyminresten im nicht-kodierenden Strang. Der Abstand des Terminators zu den Promotorelementen ist beliebig, und die Stärke des Terminators ist abhängig von der Anzahl der Thyminreste. (Bogenhagen und Brown, 1981; Geiduschek und Tocchini-Valentini, 1988). Die Erkennung des Terminationssignals und die Auflösung des ternären RNA-DNA-Polymerase-Komplexes sind zwei Vorgänge, die experimentell voneinander getrennt werden können. Die Freisetzung der RNA aus dem Komplex ist hierbei die Voraussetzung für die Dissoziation der Polymerase von der DNA (Campbell und Setzer, 1992)

1.5.4. Erleichterte Reinitiation der Pol III Transkriptionskomplexe

Nach erfolgter Termination wird die Polymerase ein weiteres Mal an den Initiator rekrutiert. Dieser Vorgang wird als Reinitiation bezeichnet. Es gibt etliche Anhaltspunkte dafür, dass die Reinitiation ein Vorgang ist, der sich von der primären Assemblierung des Transkriptionskomplexes und der ersten Rekrutierung der Polymerase unterscheidet. Einmal assemblierte Transkriptionskomplexe sind stabile Einheiten, die etliche Transkriptionszyklen durchlaufen. Kompetitionsversuche mit zweiten DNA-Matrizen („Template commitment“) zeigten, dass dabei die Transkriptionsfaktoren dieser Komplexe fest mit der ursprünglichen DNA verbunden bleiben (Bogenhagen et al., 1982; Lassar et al., 1983). Für den Pol III Transkriptionskomplex der Hefe konnte außerdem gezeigt werden, dass auch die Polymerase nach der Termination seinem Präinitiationskomplex treu bleibt und nicht auf einen anderen Präinitiationskomplex wechseln kann. Dies spricht für eine permanente Verankerung der Polymerase im Transkriptionskomplex (Dieci und Sentenac, 1996).

Während der Aufbau des Transkriptionskomplexes ein Vorgang ist, der *in vitro* etliche Minuten in Anspruch nimmt, dauert die Synthesephase der RNA nur einige Sekunden (Bieker et al., 1985; Kovelmann und Roeder, 1990; Matsuzaki et al., 1994; Bardeleben et al., 1994; Dieci und Sentenac, 1996). Auch die Reinitiation ist sowohl in der Hefe wie auch im Menschen ein sehr schneller Prozess, denn Berechnungen haben ergeben, dass pro Stunde mehrere hundert Reinitiationsvorgänge pro

Transkriptionskomplex erfolgen. Dieser Mechanismus der erleichterten Reinitiation ist vermutlich für die außerordentlich hohe Syntheseleistung der Pol III in eukaryonten Zellen verantwortlich (Kovellmann und Roeder, 1990; Dieci und Sentenac, 1996).

Während der primäre Aufbau des humanen Transkriptionskomplexes bereits durch 0,015% Sarcosyl unterbunden wird, ist ein vollständig assemblierter Komplex resistent gegen diese Sarcosylkonzentration und kann effizient reinitiiieren. Allerdings verhindert eine weitere Erhöhung der Sarcosylkonzentration auf 0,05% auch Reinitiationsvorgänge. Eine bereits rekrutierte Polymerase kann aber auch unter diesen Bedingungen eine Runde der RNA-Synthese durchführen („Single Round“ Transkription) (Kovelman und Roeder, 1990). Vergleichbare Beschränkungen sind auch mit unterschiedlichen Heparinkonzentrationen zu erzielen (Kassavetis et al., 1989; Kovelman und Roeder, 1990; Kassavetis et al., 1992).

Pol III Transkriptionskomplexe, die aus Zellextrakten an Plasmid-DNA assembliert werden, können durch Gelelektrophorese oder Glyzeringradientenzentrifugation von nicht inkorporierten Transkriptionsfaktoren isoliert werden. Diese Komplexe sind nach Zugabe von Nukleotiden transkriptionsaktiv (Wingender et al., 1984; Jahn et al., 1987).

1.6. La und die ersten Schritte der RNA-Reifung

La ist ein 50 kDa Protein, das in der Lage ist, mit verschiedenen RNAs Ribonucleoprotein Partikel (RNPs) zu bilden. Im Gegensatz zu den Ribonucleoproteinen Ro und den Sm Proteinen zeigt La eine hohe Variabilität seiner Bindungspartner. In der Tat ist La in der Lage, mit allen Pol III synthetisierten RNAs zu komplexieren (Lerner et al., 1981; Rosa et al., 1981; Rinke und Steitz, 1982; Francoeur und Mathews, 1982). Die gemeinsame Erkennungssequenz dieser RNAs ist das UUU-OH-Motiv am 3'-Ende (Stefano 1984). Es konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der RNP-Bildung mit der Kinetik der vorausgehenden *in vitro* Transkription übereinstimmt und daher während oder kurz nach der Synthese der RNA erfolgt (Francoeur und Mathews, 1982).

Da bereits bekannt war, dass im Falle der *Xenopus* Oozyten TFIIIA eine Doppelfunktion als Transkriptionsfaktor und als Komplexbildner mit der fertigen RNA zu Speicherzwecken ausübt (siehe 1.4.3.), stellte sich die Frage, ob auch für La eine Doppelfunktion als Transkriptionsfaktor und RNP-Bildner existiert. Da die

Erkennungssequenz von La gleichzeitig der Terminationssequenz der Pol III Gene entspricht, wurde zunächst eine Funktion als Terminationsfaktor diskutiert. Während bereits 1982 Francoeur und Mathews eine Beteiligung an der RNA-Synthese verneinten, wurden 1989 gegensätzliche Ergebnisse veröffentlicht. Die Depletion eines zytoplasmatischen Extraktes aus HEK-Zellen mit Antikörpern gegen Lagegen La führte *in vitro* zu einer drastischen Reduktion der RNA-Synthese und zudem zu einer Verkürzung der verbleibenden RNA Produkte (Gottlieb und Steitz, 1989a). Es wurde daher postuliert, dass La eine essentielle Funktion bei der Dissoziation des ternären DNA-RNA-Polymerase-Komplexes am Terminator zukommt. Es wurde weiterhin angenommen, dass die Freisetzung der Polymerase aus diesem Komplex die Voraussetzung für eine weitere Runde der Transkription ist (Gottlieb und Steitz, 1989b).

Untersuchungen an immobilisierten Pol III Genen unterstützten dieses Modell und postulierten zudem, dass La auch eine essentielle Proteinkomponente für die Rekrutierung der RNA-Polymerase in den Präinitiationskomplex ist und somit nicht nur als Terminationsfaktor, sondern auch als Reinitiations- und Initiationsfaktor agiert (Maraia et al., 1994; Maraia, 1996; Goodier et al., 1997; Goodier und Maraia, 1998). Überdies soll diese Rekrutierungsaktivität durch reversible Phosphorylierung an einem Serinrest an- und abgestellt werden können, wodurch La eine wichtige Funktion bei der Regulation der Pol III Transkription insgesamt zukäme (Fan et al., 1997).

Überraschenderweise konnte in anderen Organismen nicht bestätigt werden, dass La eine essentielle Funktion als Transkriptionsfaktor zukommt. Die Depletion eines *Xenopus*-Zellextraktes führte zu keiner Reduktion der Transkription (Lin Marq und Clarkson, 1998). In der Hefe wurde mit Lhp 1 (yLa) ebenfalls ein homologes Protein zu La gefunden. Interessanterweise erwies sich das Lhp1-Gen aber als nicht essentiell für das Überleben der Hefezellen, solange keine weitere Komutation vorlag (Yoo und Wolin, 1994; Lin Marq und Clarkson, 1995) Weder zeigten die mutierten Zellen eine verminderte Pol III RNA-Synthese noch waren Extrakte aus diesen Zellen in der *in vitro* Transkription in ihrer Syntheseaktivität vermindert. Auch die Zugabe von exogenem yLa führte zu keiner Stimulation der Transkription (Yoo und Wolin, 1997)

Hingegen zeigte sich für Säugetiere, *Xenopus* und Hefe, dass La wichtige Funktionen im Zuge der RNA-Reifung und der weiteren Verwendung der RNAs in der

Zelle ausübt. So schützt La das 3'-Ende von Pol III synthetisierter RNA vor dem Abbau durch Exonukleasen und macht die RNA zugänglich für spezifische Prozessasen (Yoo und Wolin, 1997; Van Horn, et al., 1997; Fan et al., 1998; Lin Marq und Clarkson, 1998; Wolin und Matera, 1999). In diesem Zusammenhang wurde auch eine Funktion als Chaperon für die U6 snRNA bei der Assemblierung des snRNP-Komplexes in der Hefe gezeigt (Pannone et al., 1998).

Eine ganze Reihe anderer Funktionen wurden La zugeordnet. So soll La den Transport von RNA zwischen verschiedenen Kompartimenten der Zelle regulieren (Boelens et al., 1995; Simons et al., 1996; Grimm et al., 1997). Histon-mRNAs werden durch La stabilisiert (McLaren et al., 1997), und überdies ist La offenbar beteiligt an der Regulation der Translation von viralen RNAs des Poliovirus und des HIV-Virus (Meerovitch et al., 1993; Svitkin et al., 1994; Craig et al., 1997). Ferner ist La beteiligt an der Regulation der Interferon-induzierten Protein Kinase und agiert in diesem Zusammenhang als „Unwindase“ von doppelsträngiger RNA (Xiao et al., 1994; Hühn et al., 1997).

1.7. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, detaillierte Analysen der einzelnen Phasen des Transkriptionszyklus sowie der daran beteiligten Transkriptionsfaktoren durchzuführen. Unter anderem sollte überprüft werden, welche Rolle der postulierte Transkriptionsfaktor La in der Pol III Transkription spielt. Weiterhin sollte die Funktion der D-Box des humanen 5S-Gens näher charakterisiert und ein möglicher D-Box-bindender Transkriptionsfaktor isoliert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN:

A. Material:

Radioaktive Nukleotide:

(^{-32}P)GTP (3000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Braunschweig;
(^{-32}P)UTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
(^{-32}P)ATP (7000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia, Braunschweig, ICN, Eschwege

Unmarkierte Nukleotide:

Ribo- und Desoxyribonukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
--	----------------------

Enzyme, Antikörper und Inhibitoren:

DNA-modifizierende Enzyme:

Restriktionsendonukleasen (jeweils mit geeignetem Puffer):	Boehringer, Mannheim; Biolabs, Schwalbach
T4-Polynukleotidkinase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP)	Boehringer, Mannheim

sonstige Enzyme:

Taq-Polymerase	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNAse A	Boehringer, Mannheim

Antikörper:

Anti-Maus Ig, ^{125}I markiert (21,3 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Anti-Maus Ig, Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Amersham Pharmacia, Braunschweig

Inhibitoren:

Heparin, Natriumsalz, Grade I-A aus Schwein	Sigma Aldrich, Deisenhofen
-Amanitin	Boehringer, Mannheim

Kits:

StrataPrep PCR (PCR Purification Kit)	Stratagene, La Jolla, USA
ECL-Western-Blotting detection reagent	Amersham Pharmacia, Braunschweig
QIAquick Nucleotide Removal Kit (250)	Qiagen, Hilden

Marker:

pBR 322 DNA-MspI Digest	Biolabs, Schwalbach
Proteinmarker (Mark 12 MW Standard)	Novex, San Diego

Gelelektrophoretische Materialien:

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Dichlorodimethylsilan	Fluka, Buds (Schweiz)
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formamid	Fluka, Buds (Schweiz)
Harnstoff	Gerbü, Gaiberg
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylenamid (TEMED)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Xylen Cyanol FF	Serva, Heidelberg

Chromatographie-Medien:

DE81 Membran	Whatman, London
EMD-DEAE Fractogel 650 (S)	Merck, Darmstadt
EMD-Heparin Fractogel	Merck, Darmstadt
EMD-SO ₃ ⁻ Fractogel 650 (S)	Merck, Darmstadt
Mono Q (Fertigsäule)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Phosphocellulose P 11	Whatman, London
ProteinA HiTrap (1ml Fertigsäule)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
ProteinG HiTrap™ (1 ml Fertigsäule)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
ProteinA Sepharose	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Q Sepharose FF (Fast Flow)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Source 15 S	Amersham Pharmacia, Braunschweig
Superdex 200 HR 10/30 (Fertigsäule)	Amersham Pharmacia, Braunschweig
UltraLink Immobilized NeutrAvidin Plus	Pierce, Rockford, USA

Reagenzien für mikrobiologische Arbeiten:

Agar	Life Technologies, Paisley, UK
Agarose	Eurogentec, Borken
Ampicillin (Binotal ^R)	Hoechst, Frankfurt
Bacto-Trypton	Life Technologies, Paisley, UK
Hefeextrakt	Life Technologies, Paisley, UK
IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranosid)	Life Technologies, Paisley, UK
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-	Boehringer, Mannheim

Galaktopyranosid (X-Gal)

Sonstige Materialien und Substanzen:

Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu, Gaiberg
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Gerbu, Gaiberg
Filterpapier 17CHR	Whatman, London
Imaging Plate BAS-MP 2040	Fuji, Kanagawa, Japan
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Mikrokollodiumhülsen	Sartorius, Göttingen
Mikrospin-Säule Mobicol	MoBiTec, Göttingen
Milchpulver	Gifco, Detroit
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Gerbu, Gaiberg
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Polaroid-Film Polapan 57	Polaroid, Frankfurt
Protein dye concentrate (Bradford)	Biorad, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Boehringer Mannheim
RNAse Block Ribonuclease Inhibitor	Stratagene, La Jolla, USA
Spermin 4HCl	Serva, Heidelberg
Spermidin 3HCl	Serva, Heidelberg
Standard-Proteingemisch für Gelfiltration	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Strataclean Resin Silica Partikel	Stratagene, La Jolla, USA
Szintillationscocktail Rotiszint ecoplus	Roth, Darmstadt
Transfermembran Immobilon P	Millipore, Bedford, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Verstärkerfolie (Intensifying Screen)	Du Pont, Nemours
X-Omat UV Film	Eastman-Kodak, Rochester

alle anderen nicht aufgeführten Chemikalien stammen von: Merck, Darmstadt

Zellkultur:

HEK-Tumorzelllinie	Institutseigene Linie
HeLa-Tumorzelllinie	Institutseigene Linie
Hybridoma-Zelllinie SW5	Dr. Michael Bachmann, Mainz
Hybridoma-Zelllinie 3B9	Dr. Michael Bachmann, Mainz
Hybridoma-Zelllinie 4B6	Dr. Michael Bachmann, Mainz
Hybridoma-Zelllinie -TBP	Institutseigene Linie

Zellkulturmaterialien:

"Minimum Essential" Medium (S-MEM)	Life Technologies, Paisley, UK
Hybridoma-Medium	Life Technologies, Paisley, UK
"New born" Kälberserum	Life Technologies, Paisley, UK

Fätales Kälberserum
Streptomycinsulfat
Penicillin-Streptomycin-Lösung
L-Glutamin

Life Technologies, Paisley, UK
Serva, Heidelberg
Life Technologies, Paisley, UK
Biochrom

Bakterienstämme:

E.coli XL1-Blue

Institutseigener Stamm

Verwendete Plasmide und andere Desoxynukleinsäuren:

pUVA1 trägt das aus pVA über Sall/AluI -Restriktion gewonnene VAI-Gen in der HincII-Stelle von pUC 18 (Schneider et al., 1989).

pBh5S wt (pBh5S) trägt das aus BamHI / Sac I gewonnene humane 5S-Gen (Sørensen et al. 1990; Nielsen et al., 1993), welches in den entsprechenden Schnittstellen in pBluescript subkloniert wurde

pBh5S-5' ist durch Ausschneiden des Accl/Accl-Fragmentes, das die 5'-fankierende Region de shumanen 5S-gens trägt, aus pBh5S und anschließender Religierung des Vektors entstanden (Haertel, 1995)

pUmU60.34 trägt das aus pMU6-52 BE (Oshima et al., 1981) über Alu I-Restriktion gewonnene U6-Gen der Maus, welches in die Hinc II-Stelle von pUC 18 kloniert wurde (Waldschmidt et al., 1991).

pUht_{met} trägt das Gen für die humane Methionin-tRNA. Es wurde aus pH2D (Santos und Zasloff, 1981) durch Insertion des gentragenden AluI / HpaII Fragmentes in die HincII-Stelle von pUC 18 subkloniert.

pB5SEhel forward: siehe 3.2.1.

pBEhe5S wt: siehe 3.2.1.

pBEhe5S ΔD-Box: siehe 3.2.1.

pBEhe5S ΔIvE: siehe 3.2.1.

poly-(dAdT)
poly-(dIdC)
pUC 9
pKS (+) Bluescript (pBluescript)

Boehringer, Mannheim
Boehringer, Mannheim
Institutseigenes Plasmid
Stratagene, La Jolla, USA

Oligonukleotide (Primer)

M13 sequencing Primer (17mer):

5' -gtaaaacgacggccagt-3'

M13 reversed sequencing Primer (17mer)

5' -caggaaacagctatgac-3'

M13 sequencing Primer (24mer)

5' -cgccagggttttcccagtcacgac-3'

M13 reversed sequencing Primer (24mer)

5' -agcggataacaatttcacacagga-3'

5S D-Box-Primer wt nicht-kodierender (+) Strang:

5' -agcttgggctcttggggcagccaggcgcttccttcagcgt-3'

5S D-Box-Primer D-Box nicht-kodierender (+) Strang

5' -agcttggggtaccggggcagccaggcgcttccttcagcgt-3'

5S D-Box-Primer wt kodierender (-) Strang

5' -agacgctgaaggaggcgctggctgccccaaagagccca-3'

5S D-Box Primer D-Box kodierender (-) Strang

5' -agacgctgaaggaggcgctggctgccccggtacccca-3'

B. Methoden:

Vorbemerkung: Die im Folgenden aufgeführten Lösungen wurden, wenn nicht gesondert angegeben, in Reinstwasser einer Christ Labostil - Anlage angesetzt (Aqua bidest)

2.1. Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

Materialien:

L-Broth Medium:	5g NaCl; 5g Hefeextrakt; 10g Trypton, ad 1000ml A. bid.
TB-Medium:	4ml 100% Glycerin; 2,31g KH ₂ O ₄ ; 12,5g K ₂ HPO ₄ , ad 1000ml A. bid.
Glycerin:	87%
Ampicillin:	100 mg/ml (Binotal ^R)

Durchführung:

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklaviertem Material unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Stammhaltung von *Escherichia coli* (*E.coli*) Zellen erfolgte in L-Broth-Glycerinkulturen. Dabei wurde ein VT (Volumenteil) einer exponentiell wachsenden LB-Flüssigkultur mit einem VT 87% Glycerin versetzt. Die Kulturen konnten dann bis zu sechs Monate bei -20°C aufbewahrt werden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde jeweils ein Aliquot einer solchen Kultur mit einer angeglühten Platinöse auf L-Broth-Agarplatten (1,5% (w/v) Agar) ausgestrichen. Ausgehend von einer der nach vierundzwanzig Stunden bei 37°C gewachsenen Kolonien wurde dann wie oben dargestellt eine frische Glycerinkultur angelegt. Die Anzucht der Bakterien wurde entweder in L-Broth-Medium (für analytische Zwecke) oder in TB-Medium (zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA) durchgeführt. Die jeweils angeimpften Medien enthielten 100 µg/ml Ampicillin und wurden bei 37°C auf dem Schüttler (250 UpM) inkubiert.

2.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.1 Präparation von Plasmid-DNA (aus *E.coli*) für analytische Zwecke („Mini-Screen“)

Materialien:

L-Broth Medium:	s. 2.1.
Ampicillin:	100 mg/ml
NaOH/SDS-Lösung.:	0,2 N NaOH, 1% SDS
Natriumacetat:	3M Natriumacetat (pH 4,8)
RNase-Lösung.:	0,1 mg/ml RNaseA in 5 mM Tris-HCl (pH 8,0)
Ethanol:	100%; 70% (v/v)

Durchführung:

Je 1ml L-Broth-Medium (mit 100 µg Ampicillin pro ml) wurden mit je einem über Antibiotikaresistenz vorselektionierten Bakterienklon unter Verwendung von sterilen Zahnstochern beimpft. Die Kulturgefäße wurden mit durchlöchernten Deckeln verschlossen und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler (250 UpM) inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge (13000 UpM) wurden die Bakterien in je 100 µl A. bid. resuspendiert und für 10 Minuten ins Eisbad gestellt. Anschließend wurden je 200 µl der NaOH/SDS-Lösung zupipettiert und die Proben für weitere 10 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach der Neutralisation durch Zugabe von je 150 µl eiskalter Natriumacetatlösung, wurden die Ansätze für weitere 20 Minuten ins Eisbad gestellt. Nach 5 minütiger Zentrifugation wurde der Überstand abgehoben und die darin befindliche DNA mit zwei Volumenteilen Ethanol (100%) gefällt, 15 Minuten zentrifugiert und das Sediment mit Ethanol (70%) gewaschen. Das Präzipitat wurde schließlich in 40 µl A. bid. und 10 µl der RNase-Lösung resuspendiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Je 10 µl dieser Plasmid-DNA Präparation wurden dann zur Restriktionsanalyse eingesetzt.

2.2.2. Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmiden in größeren Mengen (2-5mg) erfolgte mit einem DNA-Präparationskit von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.

2.2.3. Standardbedingungen zur Fällung von Nukleinsäuren**Materialien:**

EtOH/NaAcetat (30:1):	100% Ethanol; 3 M Natriumacetat (pH 5,5)
Ethanol:	70% (v/v)

Durchführung:

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit 3 Volumenteilen Ethanol/Natriumacetat-Gemisch versetzt, vorsichtig gemischt und anschließend 20 Minuten in einer Tischzentrifuge bei 13000 UpM zentrifugiert. Das Präzipitat wurde dann zur Entfernung von Salzresten kurz mit 70%igen Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Alkohol abgezogen. Das Präzipitat wurde getrocknet und in A. bid. oder entsprechendem Puffer gelöst.

2.2.4. Bestimmung der Konzentration von Desoxyribonukleinsäuren

Bei größeren DNA-Mengen erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Extinktionsmessung bei 260 nm in 1 cm Quarzküvetten mit einem Beckmann Spektralphotometer. Nach Chargaff (1955) entspricht eine $OD_{260} = 1$ einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA.

Zur Bestimmung der Konzentration kleinerer Mengen DNA wurde der visuelle Vergleich mit Proben bekannter Konzentration nach Agarose-Gelelektrophorese (2.3.1.) und anschließender Ethidiumbromidfärbung (2.2.6.) herangezogen.

2.2.5. Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen stellen einen spezifischen Schutz vor Einbau und Expression fremder DNA in Bakterien dar. Durch Erkennen spezifischer Nukleotidsequenzen und darauffolgender endolytischer DNA-Spaltung wird in Bakterien Fremd-DNA inaktiviert. Bakterieneigene DNA ist hierbei durch Modifikation (z.B. Methylierung der Erkennungssequenz) vor der Spaltung geschützt. Um ein für eine effiziente Restriktion optimales Milieu zu erstellen, wurden, je nach verwendetem Enzym, die vom Hersteller mitgelieferten 10 x Puffer eingesetzt. Ein typischer Restriktionsansatz enthielt neben der in A. bid. gelösten Proben-DNA 1/10 Volumenteil 10 x Restriktionspuffer und entsprechende Mengen an Restriktionsenzym (max. 10% des Reaktionsendvolumens = 5% Glycerin-Endkonzentration). Die Berechnung der benötigten Enzymeinheiten erfolgte in Bezug auf die vom Hersteller angegebene Unit-Definition (1 Unit schneidet 1 µg Lambda DNA unter optimalen Bedingungen in einer Stunde). Die Inkubation erfolgte zwei bis vier Stunden bei der vom Hersteller genannten Temperatur und wurde, bei präparativen Spaltungen, vor dem Stoppen der Reaktion durch Erhitzen auf eine für das Enzym spezifische Denaturierungstemperatur auf einem Agarosegel (2.3.1) überprüft.

2.2.6. Anfärbung von Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid

Im Gel fixierte DNA-Fragmente lassen sich durch Ethidiumbromid, eine polyzyklische, planare und chromophore Verbindung, die sich zwischen benachbarte Basenpaare der DNA einlagert, anfärben. Bei UV-Anregung fluoresziert der Interkalator mit einer Wellenlänge von 590 nm im rot-orangen Bereich des sichtbaren Spektrums.

Materialien:

Ethidiumbromid-Lösung:	1 µg/ml
------------------------	---------

Durchführung:

Zum Färben gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA-Fragmente wurden die Gele für 15-30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung unter leichtem Schütteln gefärbt und danach 5-10 Minuten in Wasser entfärbt. Die angefärbten Nukleinsäuren wurden auf einem UV-Leuchtschirm bei 260 (analytisches Gel) oder 365 nm (präparatives Gel) sichtbar gemacht.

2.2.7. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen mittels Elektroelution

Materialien:

Dialyseschlauch

Durchführung

Das Gelstückchen, das die angefärbte DNA enthielt, wurde mit einem Skalpell aus dem präparativen Gel ausgeschnitten und in einen Dialyseschlauch überführt, der mit 1 x TBE gefüllt war. Dann wurde der Schlauch in eine Gelelektrophoresekammer

senkrecht zum elektrischen Feld gelegt und die DNA in ca. 30 Minuten bei 100 mA aus dem Gel eluiert. Um ein Anhaften am Schlauch zu vermeiden, wurde die Kammer kurz umgepolt und 30 sec in die entgegengesetzte Richtung Spannung angelegt. Dann wurde der Puffer aus dem Schlauch entnommen und die DNA unter Standardbedingungen gefällt.

2.2.8. Dephosphorylierung von linearer DNA

Materialien:

CIP:	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm ("cip"= calf intestine phosphatase) 1 U/μl
10 x CIP-Puffer:	500 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA
PCI:	Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (50:50:1)
Ethanol/NaAcetat (30:1):	100% Ethanol; 3M Natriumacetat (pH 5,5)

Durchführung:

Ein typischer Dephosphorylierungsansatz enthielt:

0,5-5 μg Fragment bzw. linearisiertes Plasmid,
5 μl 10 x CIP-Puffer,
1 U CIP pro μg DNA,
A. bid. ad 50 μl

Nach 30 Minuten Inkubation bei 37° wurde der Ansatz zusätzlich 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit einem Volumenteil PCI extrahiert und unter Standardbedingungen (2.2.3.) die DNA gefällt.

2.2.9. Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden

Oligonukleotide, die zueinander komplementär sind, wurden in äquimolaren Mengen zueinander gegeben und in ein 95°C Wasserbad gestellt bei einer Umgebungstemperatur von 4°C. Dann wurde das Wasserbad ausgestellt und die Proben über Nacht inkubiert. Anschließend werden die nicht hybridisierten Oligos von den Hybriden auf einem 15%- oder 20%igen PAA-Gel (2.3.3.) abgetrennt. Die Hybride werden ausgeschnitten, elektroeluiert (2.2.7.) und gefällt (2.2.3.). Dann waren die Hybride einsetzbar für Subklonierungen.

2.2.10. Ligationsreaktion

Materialien:

10 x Ligasepuffer:	500 mM Tris-HCl (pH 7,4); 100 mM MgCl ₂ ; 10 mM ATP; 10 mM Spermidin
T4 DNA-Ligase	

Durchführung:

Ein Reaktionsansatz enthielt 50 ng der linearisierten und dephosphorylierten Vektor-DNA, 500 ng Fragment-DNA sowie 2 U T4 DNA-Ligase in 1 x Ligasepuffer und wurde über Nacht bei 15°C inkubiert. Mit diesem Ansatz wurden nachfolgend kompetente *E.coli* Zellen transformiert (2.2.11.).

2.2.11. Transformation

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen ist normalerweise kein effizienter Vorgang. Aus diesem Grunde müssen die Zellen zuvor durch eine Behandlung mit CaCl_2 „kompetent“, d.h. aufnahmebereit gemacht werden (Dagert und Ehrlich, 1979).

Materialien:

CaCl ₂ -Puffer:	10 mM Pipes (pH 7,0); 60 mM CaCl ₂
Glyzerin:	15% (v/v)
L-Broth-Medium:	s. 2.1.
<i>E.coli</i> :	XLI-Blue

Durchführung:

Zur Herstellung der „Ca²⁺-Zellen“ wurden 50ml L-Broth Flüssigmedium mit 2ml einer Übernachtskultur eines *E.coli* Stammes beimpft und im Schüttelinkubator (250 UpM, 37°C) bis zu einer optischen Dichte (OD₅₉₀) von 0,35 angezüchtet. Die für 10 Minuten im Eisbad abgekühlte Bakteriensuspension wurde 5 Minuten bei 8000 x g (ca. 7000 UpM, Sorvall SS-34, 4°C) zentrifugiert, das Sediment gewaschen und anschließend vorsichtig in 10 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Unter gelegentlichem Schwenken wurden die Zellen für 30 Minuten im Eisbad inkubiert, erneut 5 Minuten zentrifugiert und schließlich in 2ml eiskaltem CaCl₂-Puffer aufgenommen. Nach ca. 2 Stunden im Eisbad wurden die Zellen entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder portioniert bei -80°C eingefroren.

Im Transformationsansatz wurden jeweils 200 µl der „kompetenten“ Zellen mit 50-100ng pDNA des Ligationsansatzes gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation im Eisbad wurde der Ansatz für 45 Sekunden auf 42°C erwärmt und anschließend sofort für 2 Minuten im Eisbad inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmten (37°C) L-Broth-Medium wurden die Zellen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.12. Selektion positiver Transformanten

Durch die Insertion der zu klonierenden DNA in die Polylinkerregion der verwendeten pBluescript-Vektoren wird das β -Galaktosidase-Gen inaktiviert (Insertionsinaktivierung der -Komplementation). Eine Selektion positiver Transformanten lässt sich somit bezüglich des defekten β -Galaktosidase-Gens und der Ampicillinresistenz durchführen. Positive Klone sollten auf ampicillinhaltigen Agarplatten mit dem Farbindikator X-Gal (Amp-X-Gal) weiße Kolonien bilden, während Transformanten ohne Insertion durch die funktionsfähige β -Galaktosidase beim Abbau des Farbstoffes eine tiefblaue Indigoverbindung bilden.

Im Falle von Subklonierungen, bei denen das β -Galaktosidase-Gen bereits beim Vektor nicht mehr funktionsfähig ist (z.B. beim Einbau der Oligohybride in pB5S Ehel forward (3.2.1.)), kann kein Blau-Weiß-Screen durchgeführt werden.

Materialien:

LB-Amp-X-Gal	L-Broth Kulturmedium s. 2.1.
Agarplatten:	1,5% (w/v) Agar; 50 mg/l Ampicillin; 0,01% (w/w) X-Gal gelöst in Dimethylformamid

Durchführung:

Jeweils 50-200 μ l Aliquots der Transformationsansätze (s.o.) wurden auf L-Broth-Amp-X-Gal Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für ca. 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Alle eindeutig positiven (weißen) Transformanten wurden zur weiteren Charakterisierung in den "Mini-Screen" (2.2.1.) eingesetzt.

2.2.13. DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der subklonierten Plasmide erfolgte durch die Fa. MWG-Biotech.

2.2.14. PCR

Die unter 2.2.2. präparierte Plasmid-DNA diente als Matrize, aus der in der PCR spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert wurden. Auch Fragment-DNA kann als Matrize für die PCR verwendet werden. Die PCR-Methode wurde u.a. zur Amplifizierung von Fragmenten für die immobilisierte *in vitro* Transkription eingesetzt (s. 2.7.2.). Hierzu wurde ein Primer verwendet, der am 5'-Ende einen Biotinrest trägt, während der andere Primer unmarkiert war.

Materialien:

Plasmid-DNA /Fragment-DNA):	10 ng (1 ng)
10 x Reaktionspuffer (mit $MgCl_2$)	
Desoxynukleotidgemisch :	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Taq-Polymerase:	5 U/ μ l
spezifische Oligonukleotide (Primer):	jeweils (40 pmol/ μ l)

Durchführung:

Die Amplifizierung eines DNA-Fragmentes an Plasmid-DNA zwischen zwei spezifischen Primern erfolgte typischerweise nach folgendem Reaktionsschema:

Plasmid-DNA	10 ng
10 x Reaktionspuffer	5 μ l
Desoxynukleotide (dNTPs)	2 μ l

5'-spezifischer Primer	40 pmol (analytisch) bzw. 80 pmol (präparativ)
3'-spezifischer Primer	40 pmol (analytisch) bzw. 80 pmol (präparativ)
Taq-Polymerase	2,5 U
A.bid.	ad 50 µl

Die Amplifizierung des interessierenden DNA-Fragmentes erfolgte in einem Stratagene Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Insgesamt wurden 30 Zyklen (präparativ) durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus 3 Segmenten wie folgt bestand:

94°C, 1 Minute	(Denaturierung)
54°C, 1,5 Minute	(Hybridisierung)
72°C, 1,5 Minute	(Elongation)

Zu Beginn des ersten Zyklus wurde ein dreiminütiger Denaturierungsschritt bei 94°C vor-geschaltet. Nach Beendigung des letzten Zyklus folgte noch eine zehnminütige Elongation bei 72°C. Die PCR-Ansätze wurden auf ein präparatives Polyacrylamid-Gel (2.3.3.) aufgetragen. Das Gel wurde Ethidiumbromid gefärbt (2.2.6.) und die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde gemäß 2.2.7. elektroeluiert, unter Standardbedingungen gefällt (2.2.3.), in maximal TE-Puffer oder Wasser resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Alternativ wurde das Produkt nach 2.2.17. von den freien Primern abgetrennt.

2.2.15. Radioaktive 5'-Endmarkierung von ds oder ssDNA

Materialien:

T4-Polynukleotidkinase:	10 U/µl
10 x Kinase-Puffer:	500 mM Tris-HCl (pH 7,6); 100 mM MgCl ₂ ; 50 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM EDTA
³² P-ATP:	7000 Ci / mmol

Durchführung:

An einzelsträngigen DNA-Primern wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase die gammaständige Phosphatgruppe von ³²P-ATP auf die 5'-OH-Gruppe übertragen. Ein 30 µl Reaktionsansatz enthielt etwa 80pmol DNA (Primer), 5 µl 10 x Kinase-Puffer, 100 bis 150µCi ³²P-ATP und 10 U T4-Polynukleotidkinase ad. 50 µl A.bid. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Reaktion durch 10 minütiges Erhitzen auf 75°C gestoppt. Nichtinkorporierte Nukleotide wurden gemäß 2.2.16. abgetrennt. Wurden doppelsträngige DNA-Fragmente markiert, die eine 5'-terminale Phosphatgruppe trugen (für EMSA, 2.8.1.) musste das Fragment zuvor dephosphoryliert werden (2.2.8.).

2.2.16. Abtrennung der freien Nukleotide von DNA-Fragmenten

Die Abtrennung freier Nukleotide von DNA Fragmenten, z.B. nach γ -Markierung, erfolgte über QIAquick Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen entsprechend der Anleitung des Herstellers.

2.2.17. Abtrennung nicht-inkorporierter Oligonukleotide von PCR-Produkten

Die Abtrennung nicht-inkorporierter Oligonukleotide von PCR-Produkten erfolgte über StrataPrep PCR Purification Kit der Firma Stratagene entsprechend der Anleitung des Herstellers.

2.3. Gelelektrophoretische Methoden

2.3.1. Agarosegele

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung großer DNA-Fragmente (>600 bp) dienten native Agarose-Gele. Die Elektrophorese erfolgte in Gelen mit einem Agarosegehalt von 1% (w/v).

Materialien:

Agarose	
5 x TBE-Puffer:	450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
10 x TBE	10 x TBE mit 50% (w/v) Saccharose; 1% (w/v)
Probenpuffer:	Bromphenolblau; 1% (w/v) Xylencyanol
Geltyp:	Flachbett-Gele
Lauf:	0,5 - 2 Stunden bei 5V / cm Elektrodenabstand

Durchführung:

Die entsprechende Menge Agarose wurde unter Aufkochen in 1 x TBE-Puffer gelöst und nach kurzzeitigem Abkühlen in die Gelapparatur gegossen. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele gefärbt (2.2.6.) und die Größe und ggf. die Menge der aufgetragenen DNA-Fragmente durch Vergleich mit Markerfragmenten bekannter Größe und Konzentration nach (2.2.4.) bestimmt. Sehr dicke Agarosegele wurden bereits vor dem Gießen mit Ethidiumbromid versetzt. Während des Gellaufes wurde in diesem Fall ebenso der Puffer mit der gleichen Ethidiumbromidkonzentration versetzt.

2.3.2. Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele

Zur Analyse der durch *in vitro* Transkription synthetisierten radioaktiv markierten RNA-Moleküle wurden denaturierende 6% bis 12%ige Polyacrylamidgele verwendet.

Materialien:

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BA)-Lösung:	28,5% (w/v) : 1,5% (w/v)
--	--------------------------

Harnstoff	
5 x TBE-Puffer:	450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 1,5 mM EDTA
Laufpuffer:	1 x TBE-Puffer
Silikonlösung.:	4% (v/v) Dichlorodimethylsilan in Trichlormethan
TEMED	
APS:	10% (w/v)
Geltyp:	vertikales Gel (360 mm x 260 mm x 0,3 mm)
Lauf:	2 Stunden bei 600 V

Durchführung:

6%ige Gele enthielten bei einem Endvolumen von 70 ml:

14 ml AA/BA-Lösung
35 g Harnstoff
14 ml 5 x TBE-Puffer
A. bid. ad. 70 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert. Bevor die Gelapparatur zusammengesetzt werden konnte, wurde eine der Glasplatten mit Silikonisierungslösung behandelt. Die Polymerisation wurde mit 30 µl TEMED und 600 µl APS eingeleitet. Nach einer Polymerisationszeit von mindestens 60 Minuten wurden die Proben aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zur qualitativen Analyse autoradiographiert (2.7.1.).

2.3.3. Nichtdenaturierende Polyacrylamidgele zur nativen DNA-Auftrennung

Zur Größenbestimmung und Präparation kleinerer DNA-Fragmente (<600bp) wurden 5-20%ige native Polyacrylamid-Gele benutzt.

Materialien:

AA/BA-Lösung:	30% (w/v) : 1% (w/v)
5 x TBE-Puffer:	siehe 2.3.1.
10 x-Probenpuffer:	siehe 2.3.1.
TEMED	
APS:	10% (w/v)
Laufpuffer:	1 x TBE-Puffer
Geltyp:	vertikales Gel (125 mm x 100 mm x 1,5 mm)
Lauf:	1-3 Stunden bei 60 mA

Durchführung:

Zur Polymerisation wurden 30 µl TEMED und 300 µl APS zugegeben. Der Probenauftrag erfolgte nach einer Polymerisationszeit von 30 Minuten. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer. Die Gele wurden gefärbt (2.2.6.) und bei 260 nm auf einem

Leuchtschirm fotografiert (analytische Gele) oder auf einem 365 nm Leuchtschirm die spezifischen Banden ausgeschnitten (präparative Gele).

2.3.4. Nicht denaturierende Gele zur Auftrennung von nativen Protein-DNA Komplexen (EMSA-Gele)

Materialien

AA/BA-Lösung:	80% (w/v) : 1% (w/v)
100 x RA-Puffer:	0,67 M Tris-HCl (pH 7,9); 0,33 M Natriumacetat, 0,1 M EDTA
APS:	10% (w/v)
Laufpuffer:	1 x RA
Geltyp:	vertikales Gel (16 cm x 12,5 cm x 1,5 mm)
Lauf:	ca 3 h bei 120-150 V
Glyzerin:	87%
Temed	

Durchführung

Die Gele enthielten bei einem Endvolumen von 40 ml:

4 ml AA/BA-Lösung
0,4 ml 100 x RA-Puffer
1,1 ml Glyzerin
A. bid. ad 40 ml

Die Polymerisation wurde mit 40 µl TEMED und 400 µl APS gestartet. Der Probenaufrag erfolgte nach einer Polymerisationszeit von mindestens 30 Minuten bei einer angelegten Spannung von 80 V. Die Elektrophorese wurde bei 4°C durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel bei 100°C getrocknet und anschließend autoradiographiert (2.9.1.) bzw. durch einen Phosphor Imager (2.9.3.) ausgewertet.

2.3.5. SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (nach LAEMMLI, 1970)

Materialien:

AA / BA-Lösung:	30% (w/v) : 0,8% (w/v);
Tris-HCl	1,5 M, pH 8,6 für Trenngel 0,5 M, pH 6,8 für Sammelgel
SDS	10% (w/v)
Gelkammer:	Vertikaler Typ
Probenpuffer:	50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% Glyzerin; 1% (w/v) SDS; 50 mM DTT; 0,01% (w/v) Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-HCl (pH 6,8); 190 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
APS	10% (w/v)

n-Butanol	H ₂ O-gesättigt
TEMED	

Durchführung:

Das Sammelgel (5%) enthielt bei einem Volumen von 15 ml:

2,5 ml AA/BA 30:0,8
3 ml Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
0,145 ml 10% (w/v) SDS
A. bid. ad. 15 ml

Das Trenngel (i.d.F. 12,5%) enthielt bei einem Volumen von 30 ml:

13,2 ml AA/BA
7 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,6
0,29 ml 10% SDS
A. bid. ad. 30 ml

Glasplatten, Spacer und Probenkamm wurden gewaschen und über Nacht in 1 M NaOH oder 1%ige SDS-Lösung eingelegt.

Alle Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. Zunächst wurde die Polymerisation des Trenngels mit 15 µl TEMED und 300 µl APS initiiert, das Gel in die Gelkammer gegossen und sofort mit n-Butanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das n-Butanol abgegossen, mit A.bid. ausgespült und das mit 10 µl TEMED und 100 µl APS versetzte Sammelgel über das polymerisierte Trenngel gegeben. Die zu analysierenden Proteinfractionen wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden die Proben 10 Minuten bei 75°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte entweder über Nacht bei 10 mA oder am Tag bei 40 mA, anschließend wurden die Proteine nach 2.6.15 und 2.6.16. gefärbt, oder das Gel wurde geblottet (2.6.13.)

2.4. Zellkultur**2.4.1. Anzucht menschlicher Tumorzellen in Suspensionskultur****Materialien:**

Eagle's Minimalmedium	
New Born Kälberserum	
Antibiotika-Lösung:	Penicillin: 1000 U/ml; Streptomycin: 755 U/ml
Streptomycinsulfat	
Natriumhydrogencarbonat	

Durchführung:

Anzucht und Stammhaltung der menschlichen Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa und der embryonalen Nierenzelllinie HEK erfolgte in „Eagle's minimal essential medium“ (S-MEM) unter Zusatz von 5% (v/v) „new born“ Kälberserum, 1% (v/v) Penicillin-

Streptomycin-Lösung, 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat und 2,2 mg/ml Natriumhydrogencarbonat bis zu einer Zelldichte von $4-6 \times 10^5$ Zellen pro ml Medium.

2.4.2. Expression monoklonaler Antikörper

Materialien:

Hybridoma-Medium	
Fätales Kälberserum	
L-Glutamin	200 mM
Penicillin/Streptomycin-Lösung	10000 µg/ml

Durchführung:

Drei Hybridomazelllinien, die Antikörper gegen La (SW5, 3B9, 4B6) sowie eine Linie, die Antikörper gegen TBP erzeugt, wurden in Hybridomamedium angezogen unter Zusatz von 10% Fätalem Kälberserum, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung. Nach ca. 4-6 Tagen Inkubation in Kulturflaschen (das Medium soll bereits gelb gefärbt sein) wurde ein kleines Aliquot ca. 1:30 mit frischem Medium verdünnt und erneut inkubiert. Die restliche Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (10 min bei 800 UpM, Heraeus Cryofuge 6-6). Da die Antikörper von den Zellen in das Medium sezerniert werden, wurde das Pellet verworfen (alternativ wurde es auch zur weiteren Anzucht resuspendiert) und die Antikörper aus den Zellüberständen nach 2.6.8 isoliert. Die Anti-TBP Zelllinie, nicht aber die Anti-La Zelllinien konnte alternativ auch in RPMI 1640 Medium gezogen werden.

2.5. Präparation zellfreier Extrakte

2.5.1. Präparation von zytoplasmatischem Extrakt (S100) aus HeLa- oder HEK-Zellen (nach Weil et al., 1979)

Materialien:

Puffer 1:	30 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl
Puffer 2:	10 mM Tris-HCl (pH 7,9); 10 mM KCl;
	1,5 mM MgCl ₂ ; 0,5 mM DTT
Puffer 3:	300 mM Tris-HCl (pH 7,9); 1,4 M KCl; 30 mM MgCl ₂
DTT	
PMSF:	100 mM in Isopropanol

Durchführung:

Die Zellen wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei $1000 \times g$ (1300 UpM, 4°C) sedimentiert und mit Puffer 1 gewaschen. Nach Bestimmung des „packed-cell-volume“ (PCV) wurden die Zellen anschließend durch Aufnahme in 2,5 x PCV hypotonem Puffer 2 und Inkubation für 20 Minuten im Eisbad zum Quellen gebracht. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese im Potter homogenisiert, wobei die Vollständigkeit der Homogenisierung lichtmikroskopisch verfolgt wurde (Zerstörung

der Zellmembran unter Erhalt der intakten Kerne). Nachdem durch Zufügen von 1/10 Volumenteil hypertonem Puffer 3 wieder isotonische Bedingungen hergestellt worden waren, folgte eine Ultrazentrifugation für 90 Minuten bei 100000 x g (= 33000 UpM; Beckmann Ti 60) und 4°C, bei der Kerne und Zelltrümmer sedimentieren. Der „S100“-Überstand (S = Supernatant) wurde dekantiert mit Glycerin auf eine Endkonzentration von ca 10% Glycerin verdünnt, mit 3 mM DTT und 0,2 mM PMSF versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration der Überstände betrug 10-15 mg/ml.

2.5.2. Präparation von Kernextrakt (modifiziert nach Shapiro et al., 1988)

Materialien:

Puffer 1:	30 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl;
Puffer 2:	10 mM Hepes (pH 7,9); 0,75 mM Spermidin-3HCl; 0,15 mM Spermin-3HCl, 0,1 mM EDTA (pH 8); 0,1 mM EGTA (pH 8), 7,5 mM DTT; 10 mM KCl
Puffer 3:	0,5 M Hepes (pH 7,9); 7,5 mM Spermidin-3 HCl; 1,5 mM Spermin-3 HCl, 100 mM KCl; 2 mM EDTA; 7,5 mM DTT
Puffer 4	9 Volumen 75% (w/v) Saccharose, 1 Vol. Puffer 3
Puffer 5:	20 mM Hepes (pH 7,9); 0,75 mM Spermidin-3 HCl, 0,15 mM Spermin-3HCl, 0,2 mM EDTA; 0,2 mM EGTA, 7,5 mM DTT; 25% Glycerin
Ammonium-sulfatlösung	gesättigte Lösung bei 0°C (>3,9 M Ammoniumsulfat)

Durchführung:

Bei einer Zelldichte von $4-7 \times 10^5$ Zellen / ml Medium wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 700 UpM (170 x g) und 4°C pelletiert und dann in Puffer 1 gewaschen. Das PCV („packed cell volume“) wurde durch Aufnahme der Zellen in 100 ml Puffer 1 bestimmt ($PCV = x \cdot 100 \text{ ml}$). Die Zellen wurden in 5 x PCV (hypotonem) Puffer 2 aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis quellen gelassen. Nach erneuter Pelletierung und Aufnahme in 2 x PCV Puffer 2 wurden die Zellen durch fünfmaliges Pottern aufgeschlossen. Um die noch intakte Kernmembran zu schützen, wurde zügig durch Zugabe von 0,1 VT Puffer 4 wieder isotone Verhältnisse geschaffen. Danach wurden die Kerne durch 30-60 Sekunden Zentrifugation bei 10000 UpM im Sorvall HB4-Rotor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet aus den Kernen wurde in 3 ml / 10^9 Zellen Puffer 5 durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in einer 10 ml Glaspipette homogenisiert und in ein Becherglas großen Durchmessers überführt. Über 10 Minuten wurden 0,1 Volumenteile der gesättigten Ammoniumsulfatlösung tropfenweise zugesetzt und somit die Kerne aufgeschlossen. Nach Zugabe etwa der Hälfte der Ammoniumsulfatlösung bildete sich ein zäher Schleim. Nach weiteren 30 Minuten Rühren wurde die hochvisköse Lösung in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und 90 Minuten bei 40000 UpM (180000 x g, Beckmann Ti-55.2, 4°C) zentrifugiert. Danach wurde vorsichtig eine kleine Lipidschicht abgehoben und der Überstand dekantiert. Dieser wurde unter zweimaligem Pufferwechsel 6-8 Stunden gegen Phosphocellulosepuffer dialysiert (2.6.3.).

2.6. Arbeiten mit Proteinen

2.6.1. Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat

Materialien:

Ammoniumsulfat
Dialyseschlauch

Durchführung:

Die Proteinfractionen wurden in Dialyseschläuchen in Transkriptionspuffer dialysiert, der die entsprechenden Ammoniumsulfatkonzentrationen enthielt.

Dann wurde die Lösung 60 Minuten in einer Sorvall Zentrifuge bei 9000 UpM (HB-4 Rotor; 4°C) zentrifugiert. Das Sediment wurde in einem geringen Volumen Transkriptionspuffer aufgenommen und ebenso wie der Überstand gegen Transkriptionspuffer dialysiert.

2.6.2. Proteinkonzentrationsbestimmung durch kolorimetrische Proteinquantifizierung (Bradford, 1976)

Zur kolorimetrischen Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das "Protein dye reagent concentrate" der Firma Biorad nach Vorschrift angewandt und die Extinktion bei 595 nm im Vergleich zu BSA-Standardwerten gemessen.

2.6.3. Dialyse von Proteinlösungen

Materialien:

Dialyseschläuche	
Mikrokollodiumhülsen	
BSA	20 mg/ml in Transkriptionspuffer (2.6.4)

Durchführung:

Die Dialyse von Zellextrakten oder gereinigten Proteinfractionen erfolgte bei kleineren Mengen (100-500 µl) in Mikro-Kollodiumhülsen der Firma Sartorius, bei größeren Mengen in Dialyseschläuchen. Die Schläuche wurden zur Entfernung enzymatischer Verunreinigungen und zum Quellen vor Gebrauch kurz aufgekocht. Der Puffer wurde vor Verwendung mittels einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Proben wurden bei 4°C so lange gegen den gewünschten Puffer dialysiert, bis die Leitfähigkeit der Proben mit der des umgebenden Puffers übereinstimmte. Sehr empfindliche Proteinfractionen mit niedriger Proteinkonzentration (z.B. TFIIC1 (MQ)) wurden vor der Dialyse mit 0,2 mg/ml BSA versetzt.

2.6.4. Reinigung von Proteinfractionen über Niederdruck-Chromatographie (Liquid Chromatography, LC), Phosphocellulose

Materialien:

Phosphocellulose P 11	
Phosphocellulose-Puffer:	20 mM Hepes (pH 7,9); 100 mM KCl; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 10% (v/v) Glycerin
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glycerin; 60 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF

Durchführung:

Die Phosphocellulose (Whatman P 11) musste vor Gebrauch in die Na⁺-Form gebracht (Schwartz et al., 1974) und anschließend mit 5-10 Säulenvolumina (SV) Phosphocellulose (PC)-Puffer äquilibriert werden. Für die nach Segall et al. (1980) beschriebene Separation der menschlichen Transkriptionsfaktoren IIIA, IIIB und IIIC durfte eine Beladung von 10 mg Protein pro ml Säulenbett nicht überschritten werden. Da jedoch etwa 50% der Proteine im Durchbruch (PC-A) erschienen, konnte die Beladungskapazität auf 20 mg/ml Bettvolumen erhöht werden. Der Auftrag des Zellextraktes erfolgte nach Dialyse gegen Phosphocellulosepuffer auf die Säule mit 0,5 Säulenvolumen pro Stunde. Die Durchbruchfraktion wurde mit 0,1 M KCl gewaschen, bis die Nulllinie des an eine UV-Einheit (280nm) angeschlossenen Schreibers erreicht war. Anschließend wurde die anderen Fraktionen mit 0,35 M (PCB), 0,6 M (PCC) und 1 M KCl (PCD) eluiert. Das Proteinprofil wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Alle Fraktionen wurden gegen 60 mM KCl Transkriptionspuffer dialysiert (2.6.3.).

2.6.5. Reinigung von Proteinfractionen über Mitteldruck-Chromatographie

2.6.5.1. Anionentauscher

Materialien:

Säulenmaterialien	EMD-DEAE-Fractogel 650S (EDF) MonoQ (Fertigsäule: 8 bzw. 1 ml) Q-Sepharose FF
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glycerin; 60 mM bzw. 1M KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF
La-Puffer	2.6.6.5.

Die Mitteldruckchromatographien wurden an einer Biologic Anlage von Biorad durchgeführt.

Durchführung:

Die Säule wurde mit 4-6 Säulenvolumina äquilibriert. Es wurden maximal 10 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde je nach Anwendung mit einem Salzgradienten oder mit mehreren Salzschriften eluiert. Die Flussrate war abhängig von der Größe der Säule und von dem anfallenden Druck. Gradienten wurden fraktioniert gesammelt.. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M KCl.

2.6.5.2. Kationentauscher**Materialien:**

Säulenmaterialien:	EMD-SO ₃ ⁻ -Fractogel 650S, Source 15S
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glyzerin; 60 mM bzw. 1M KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF

Durchführung:

Die Säule wurde mit 4-6 Säulenvolumina äquilibriert. Es wurden maximal 10 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde je nach Anwendung mit einem Salzgradienten oder mit mehreren Salzschriften eluiert. Die Flussrate war abhängig von der Größe der Säule und von dem anfallenden Druck. Gradienten wurden fraktioniert gesammelt.. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M KCl.

2.6.5.3. Gelfiltration, „Size Exclusion Chromatography“ (SEC) (analytisch)**Materialien:**

Säulenmaterialien	Superdex 200 HR 10/30
Standardproteingemisch	bestehend aus Dextranblau, BSA und Cytochrom C
Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glyzerin; 60 mM; 5 mM MgCl ₂ ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF

Durchführung:

Proteine wurden nach ihrer Größe getrennt durch Gelfiltration (Size Exclusion Chromatographie (SEC)). Die Säule wurde vor Gebrauch mehrere Stunden mit Transkriptionspuffer äquilibriert. Dann wurden maximal 200 µl der zu analysierenden Fraktion aufgetragen und nach 7 ml wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt. Das Ausschlussvolumen und die Größe der zu erwartenden Proteine in den Fraktionen wurde in einem Eichlauf durch Standardproteine ermittelt (Dextranblau, BSA und Cytochrom C).

2.6.5.4. Heparin Fractogel

Materialien:

Säulenmaterialien	EMD-Heparin-Fractogel
La-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20% Glycerin; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM DTT) mit 1M NaCl

Durchführung:

Die Säule wurde mit 4-6 Säulenvolumina äquilibriert. Es wurden maximal 7 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde mit einem Salzgradienten von 100 bis 500 mM NaCl eluiert. Die Flussrate war abhängig von der Größe der Säule und von dem anfallenden Druck. Gradienten wurden fraktioniert gesammelt. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M NaCl.

2.6.6. Präparation der Transkriptionsfaktoren und anderer Proteine

Zytoplasmatische Zellextrakte oder Zellkernextrakte wurden durch Phosphocellulose-Chromatographie in die Fraktionen PCA (Durchbruch, 100 mM KCl), PCB (350 mM), PCC (600 mM) und PCD (1M KCl) getrennt (2.6.4.). Der Transkriptionsfaktor IIIA zeigt unterschiedliche chromatographische Eigenschaften und findet sich sowohl im Durchbruch (PCA) wie auch in der PCD. Die Transkriptionsfaktoren IIIB , IIIB β sowie ein Teil der Polymerase III eluieren in der PCB. In der PCC eluieren die Transkriptionsfaktoren TFIIIC1, TFIIIC2, TFIIIC1_{like}, TBA, TFIIU, PBP sowie ebenfalls Polymerase III.

Um die Transkriptionsfaktoren kreuzkontaminationsfrei darzustellen, wird mindestens ein weiterer Chromatographieschritt benötigt.

2.6.6.1. Präparation von TFIIIA (nach Seifart et al., 1989)

Die Durchbruchfraktionen (PCA) einiger Phosphocellulosesäulen wurden vereinigt (ca. 2 Liter) und sukzessive auf ca. 650 mM KCl hochgesalzt. Vermutlich werden hierdurch TFIIIA-RNA Komplexe aufgetrennt, wodurch sich das chromatographische Verhalten von TFIIIA stark ändert (Seifart et al., 1989). Die Fraktion wurde dann erneut über eine 5 bis 10 ml Phosphocellulose gegeben, der Durchbruch (PCAA) aufgefangen und TFIIIA mit 1 M KCl eluiert (PCAD). Anschließend wurde die PCAD gegen 1 x Transkriptionspuffer dialysiert.

2.6.6.2. Weitere chromatographische Trennung der PCB und PCC

Die Standardauftrennung der PCB erfolgte über eine 27 ml EDF-Säule. Die PCB wurde gegen 1 x Transkriptionspuffer dialysiert aufgetragen und mit einem 200 ml-Gradienten von 60-450 mM KCL eluiert. 40 Fraktionen von 5 ml wurden aufgefangen.

TFIIIB eluierte mit ca. 170 mM, TFIIIB β mit 280 mM und Polymerase III mit 350 mM KCl (Teichmann und Seifart, 1995).

Die Standardreinigung der PCC erfolgte über eine 8 ml MonoQ-Säule. Die PCC wurde gegen 1 x Transkriptionspuffer dialysiert aufgetragen und mit einem 160 ml Gradienten von 60-450 mM KCL eluiert. 40 Fraktionen von 4 ml wurden

aufgefangen. TFIIC0 eluierte mit 150 mM KCl, TFIIC1 mit 250 mM und TFIIC2 mit 370 mM KCl (Yoshinaga et al., 1987, Oettel et al., 1997, Oettel, 1998). Die Fraktionen wurden entweder weiter gereinigt (2.6.6.4.) oder gegen 1 x Transkriptionspuffer dialysiert.

2.6.6.3. Präparation von TFIIB β und Polymerase III

Die TFIIB β -Fraktionen aus dem EDF-Lauf wurde vereinigt und mit Transkriptionspuffer ohne KCl verdünnt, bis die KCl Konzentration bei etwa 150-200 mM KCl lag. Dann wurde die Fraktion auf eine 7 ml Fractogel SO³⁻ Säule aufgetragen und mit 250 mM, 400 mM und 1000 mM KCl eluiert (2.6.5.2.). Die TFIIB β -Aktivität eluierte in der 400 mM Fraktion. Sie war frei von Polymerase III- sowie TFIIC1- und TFIIC2-Aktivitäten. Danach erfolgte eine Dialyse gegen 1 x Transkriptionspuffer (2.6.3.)

Die Polymerase Fraktionen aus dem EDF Lauf wurden vereinigt und mit Transkriptionspuffer ohne KCl verdünnt, bis die KCl Konzentration bei etwa 300 mM KCl lag. Dann wurde die Fraktion auf eine 7 ml Fractogel SO₃- Säule aufgetragen und mit 400 mM, 650 mM und 1000 mM KCl eluiert. Die Pol III-Aktivität eluierte in der 650 mM Fraktion. Sie war frei von TFIIB β sowie von TFIIC1 und TFIIC2 Aktivitäten (Daten nicht gezeigt). Die Fraktion wurde mit Glyzerin auf eine Endkonzentration von ca. (50% v/v) verdünnt und portioniert à 50 μ l bei -80°C weggefroren.

2.6.6.4. weitere Reinigung von TFIIC1, TFIIC2 und TFIIC0

Die MQ-TFIIC1 und TFIIC2 Fraktionen sind fast vollständig frei von Kreuzkontaminationen mit den anderen basalen Transkriptionsfaktoren und können daher in einem rekonstituierten Transkriptionssystem eingesetzt werden. Eine weitere Reinigung dieser Faktoren kann aber erreicht werden über eine Kationentauscher-Chromatographie (2.6.5.2.). Daher wurden die Ausgangs MQ Fraktionen gegen 60 mM KCl (2.6.3.) dialysiert, jeweils auf eine 7 ml SO³⁻ aufgetragen und mit einem linearen Gradient von 60 mM bis 600 mM KCl eluiert. TFIIC1 eluierte im Bereich von 450-500 mM KCl, TFIIC2 eluierte im Bereich von 460 bis 500 mM.

Die verschiedenen Aktivitäten, die in der TFIIC0 Fraktion enthalten sind, können entweder über EMD-SO³⁻ oder über Resource S voneinander abgetrennt werden. Die TFIIC0 Fraktion wurde undialysiert auf eine 7 ml Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 170 bis 650 mM KCL von der SO³⁻ bzw. von 170 bis 450 mM KCl von der Resource S. TFIICU eluierte von der SO³⁻ bei 400 mM, TBA bei 440 und TFIIC1_{like} bei 520 mM KCl. TFIICU fand sich im Durchbruch der Resource S wieder, TBA eluierte hier bei 240 mM und TFIIC1_{like} bei 320 mM.

2.6.6.5. partielle Reinigung von La aus der PCA

Materialien:

La-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20% Glyzerin; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM DTT) mit 100 mM NaCl
La-puffer (1M KCl)	25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20% Glyzerin; 0,1 mM EDTA; 0,5 mM DTT) mit 1M NaCl

Durchführung:

Da La ein sehr vielfältiges chromatographisches Verhalten zeigt, ist es nicht möglich, La aus nur einer Ausgangsfraction zu reinigen und zu isolieren (siehe 3.1.3.)

Daher wurde versucht, die von Fan et al., 1997 beschriebene Trennung von S-La und U-La durchzuführen. Die Reinigung erfolgte sowohl aus HeLa Kern-Extrakt wie auch aus S100. Aus der PCA dieser Fraktionen sollte über Q-SepharoseFF das angeblich transkriptionsaktive S-La vom inaktiven U-La abgetrennt werden. Die PCA wurde gegen La-Puffer dialysiert und auf eine Q-SepharoseFF Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 200 mM, 300 mM, 550 mM und 1000 mM NaCl. Alle Eluate enthielten La. Die größte Menge La fand sich in der 0,3 bis 0,55 M Fraktion, welche das U-La enthalten soll. In der Durchbruchfraktion, welche das S-La enthalten soll, konnte kein La nachgewiesen werden. Die 350-550 mM Fraktion, stammend aus dem Kernextrakt, wurde weiter über Heparin-Fractogel (2.6.5.4) gereinigt. Die daraus resultierenden Fraktionen wurden als Positivkontrolle in Western Blots eingesetzt.

2.6.7. Isolierung von Transkriptionskomplexen durch Glyzeringradienten-zentrifugation**Materialien:**

Zentrifugenröhrchen	Röhrchen für SW60 Rotor
Glyzerinlösung:	15% (v/v) (Puffer A) bzw. 30% (v/v) (Puffer B) in 1 x Transkriptionspuffer (2.5.2.1.)

Durchführung:

In 4,2 ml SW60 Zentrifugenröhrchen wurde mit Hilfe der Biologic Pumpe Gradienten mit unterschiedlichen Anfangs und Endkonzentrationen erstellt. Durch den Stufengradienten war gewährleistet, dass nach Abnahme der obersten 200 µl immer noch die geringste Glyzerinkonzentration vorlag. Dann wurden identische 25 µl Transkriptions-Ansätze gepoolt und 200 µl auf den Gradienten aufgetragen. Eine Anfangskonzentration von 15% und eine Endkonzentration von 30% erwiesen sich als optimal (Daten nicht gezeigt).

Zusammensetzung des Stufengradienten:

Volumen der Stufe	Anteil Puffer B (%)	Glyzerin-Endkonzentration (%)
0,2 ml	100	30
0,5 ml	86	27,9
0,5 ml	72	25,8
0,5 ml	58	23,7
0,5 ml	44	21,6
0,5 ml	30	19,5
0,5 ml	15	17,25
ca. 1 ml	0	15%

Nach dreistündiger Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 50000 UpM (33000g) (SW 60) und 4°C wurden 12 Fraktionen von je 350 µl vom Gradienten (von oben

nach unten) abgehoben. Je 40 µl dieser Fraktionen wurden nachfolgend in der *in vitro* Transkription auf spezifische Transkriptionsaktivität getestet (siehe 2.7.).

2.6.8. Reinigung von monoklonalen Antikörpern aus Hybridoma-Zellüberständen.

Materialien:

Chromatographiesäule	HiTrap ProteinG (1 ml)
Waschpuffer	1 x Transkriptionspuffer, 600 mM KCl
Elutionspuffer	0,1 M Essigsäure, 0,15 M NaCl, pH 2,75
Neutralisationspuffer	1M Tris, pH 7,9

Durchführung:

Nach Abzentrifugieren der Zellen (2.4.2.) wurden ca. 500-1000 ml Überstand bei 4°C über eine 1 ml ProteinG HiTrap Säule gegeben. Nach einem Waschschrift wurden die Antikörper mit dem Elutionspuffer in ein Gefäß eluiert, in das zuvor ca. 1/10 des zu erwartenden Elutionsvolumens (ca. 3 ml) Neutralisationspuffer gegeben wurde. Sofort wurden die Antikörper unter mehrmaligem Wechseln des Puffers gegen 1 x Transkriptionspuffer über Nacht dialysiert (2.6.3.). Die Reinheit der Antikörper wurde durch SDS Gelelektrophorese (2.3.5.) und nachfolgender Coomassiefärbung (2.6.15) bestimmt, ihre Aktivität mittels eines Streifenblots (2.6.13.1) bestimmt.

2.6.9. Reinigung von IgGs aus Kaninchen-Serum

Materialien:

Chromatographiesäule	HiTrap ProteinG (1 ml)
Waschpuffer	1 x Transkriptionspuffer, 600 mM KCl
Elutionspuffer	0,1 M Essigsäure, 0,15 M NaCl, pH 2,75
Neutralisationspuffer	1M Tris, pH 7,9

Durchführung:

10 ml Kaninchenserum wurde über eine 1 ml ProteinG HiTrap Säule gegeben. Nach einem Waschschrift wurden die Antikörper mit dem Elutionspuffer in ein Gefäß eluiert, in das zuvor ca. 1/10 des erwartenden Elutionsvolumens (ca. 3 ml) Neutralisationspuffer gegeben wurde. Sofort wurden die Antikörper unter mehrmaligem Wechseln des Puffers gegen 1 x Transkriptionspuffer über Nacht dialysiert (2.6.3.). Die Reinheit der Antikörper wurde durch SDS Gelelektrophorese (2.3.5.) und nachfolgender Coomassiefärbung (2.6.15) bestimmt.

2.6.10. Irreversible Immobilisierung von Antikörpern an HiTrap™ ProteinA Säulen bzw. an ProteinA-Sepharose

Materialien:

Matrix	Protein A Sepharose oder HiTrap ProteinA Säule (1 ml)
Bindungspuffer	1 x TXN
Waschpuffer 1	3 M NaCl, 50 mM Natriumborat (pH 9)
Waschpuffer 2	3 M NaCl, 200 mM Natriumborat (pH 9)
Kopplungspuffer	3 M NaCl, 200 mM Natriumborat, 20 mM Dimethylpimelimidat
Stopppuffer	200 mM Ethanolamin (pH 8,0)
Natriumazid	20% (w/v)

Durchführung:

Nachdem die monoklonalen Antikörper bzw. die Serumantikörper nach 2.6.8. bzw. 2.6.9. gereinigt worden sind und ggf. auf ihre Aktivität untersucht wurden, wurden jeweils 6 mg Antikörper entweder auf eine 1ml HiTrap ProteinA-Säule oder auf eine 1 ml ProteinA Sepharose-Säule aufgetragen (0,2 SV/min). Danach wurden 10 SV (=10 ml) Waschpuffer 1 und 10 SV Waschpuffer 2 über die Säule gegeben. Die Bindungseffizienz wurde auf einem SDS-Gel überprüft (2.3.5.). Sie betrug in jedem Fall > 95%. Der Kopplungspuffer (10SV = 10 ml) wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,25 SV/min (=0,25 ml/SV) über die Säule gegeben, sodass die Inkubation für 40 Minuten erfolgte. Anschließend wurde durch den Stopppuffer die Kopplung beendet und ungenutzte ProteinA Bindungsstellen blockiert (ca. 40 SV bei 0,2 SV/min). Die Säule wurde mit 1 x Transkriptionspuffer äquilibriert und war dann bereit für Immunodepletionen. Längere Lagerungen der HiTrap Säule erfolgten unter 1 x Transkriptionspuffer/0,02% Natriumazid. Die ProteinA Sepharose wurde nach der Äquilibration aus der Säule entnommen und war dann bereit für Immunopräzipitationen.

(Murine Antikörper der Subklasse IgG 1 binden nach diesem Protokoll nicht an ProteinA Sepharose (z.b. 4B6). Entweder muss bereits der Auftragsschritt unter hochmolarem NaCl/Borax Puffer erfolgen oder besser ist die Verwendung von ProteinG Sepharose. ProteinG bindet alle murinen IgG-Subklassen unter Niedrigsalzbedingungen.

2.6.11. Immunodepletion mittels Säulenchromatographie.

Materialien:

Blockierungslösung	2 mg/ml BSA in 1 x Transkriptionspuffer, sterilfiltriert
Antikörpersäulen	HiTrap , kovalent gekoppelt mit Antikörpern gegen TBP, La (SW5) oder mit Serum-Antikörpern (2.5.12)
Waschpuffer	1 x Transkriptionspuffer, 600 mM KCl
Elutionspuffer für TBP-Säule	1 x Transkriptionspuffer, 5 M Harnstoff

genereller Elutionspuffer	0,1 M Glycin, pH 2,8
andere Elutionspuffer	5M Harnstoff (für TFIIIB β -Elution von Anti-TBP MAb-Säule) 3,5 M MgCl ₂ 3 M Thiocyanat 0,1 M Glycin (pH1,8) 1% SDS Glycin-NaOH (pH 10-11)

Durchführung:

Die Antikörpersäule, die nach 2.6.10. präpariert worden ist, wurde zunächst mit der Blockierungslösung unter langsamen Fluss für ca. 20 Minuten behandelt, um unspezifische Bindungen der Proteine der Probe mit dem Säulenmaterial zu vermeiden.

Die zu depletierende Proteinfraction (bzw. das Fraktionsgemisch) wurde mit 0,05 bis 0,1 SV/min mit Hilfe einer Biologic Mitteldruck-Anlage über die Säule gegeben. Die Säule war zuvor mit 1 x Transkriptionspuffer äquilibriert worden. Der Durchbruch wurde fraktioniert aufgefangen. Anschließend wurden etwaige unspezifische Assoziate mit dem Waschpuffer entfernt. Zur Elution der Antigene sind unterschiedliche Elutionspuffer gängig. TFIIIB β wird durch 5 M Harnstoff in 1 x Transkriptionspuffer effektiv eluiert. Durch direkte Dialyse über Nacht gegen 1 x Transkriptionspuffer mit mehrfachen Pufferwechsel wird der Harnstoff entfernt (2.6.3.).

Andere Antikörper-Antigen-Komplexe sind unter diesen Bedingungen nicht aufzubrechen. Der gängigste Elutionspuffer ist 0,1 M Glycin-HCl (pH 2,8). La kann aber auch durch diesen Puffer nur zum Teil von der SW5-Säule eluiert werden, insbesondere wenn die Beladung der Säule mit Antikörpern > 0,1 mg/ml beträgt (pers. Mitteilung: Michael Bachmann). Radikalere Methoden wie Thiocyanat, Glycin-HCl (pH1,8) oder gar 1% SDS führen zur Zerstörung der Säule.

2.6.12. Immunopräzipitation von RNA-La-Komplexen

Diese Methode wurde angewendet zur Detektion von spezifischen RNA-La Komplexen nach einer Standard *in vitro* Transkription.

Materialien:

Blockierungslösung:	2 mg/ml BSA in 1 x Transkriptionspuffer, sterilfiltriert
immobilisierte Antikörper:	ProteinA Sepharose, kovalent mit SW5 Antikörpern gegen La gekoppelt (2.6.10)
nicht gekoppelte ProteinA Sepharose	
Waschpuffer:	1 x Transkriptionspuffer
Stopp- und Elutionspuffer für RNA:	ProteinaseK/ SDS

Durchführung:

Transkriptionsansätze, die nach 2.7.1. erstellt wurden, wurden nach der Inkubation (90 Minuten) mit ProteinA Sepharose oder SW5 gekoppelter ProteinA Sepharose versetzt und für 30 Minuten unter mehrfachem Resuspendieren bei RT inkubiert. (Die Sepharose wurde zuvor mit der Blockierungslösung behandelt und danach dreimal mit Transkriptionspuffer gewaschen). Danach wurde die Sepharose abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Sepharose wurde dreimal mit 1 x Transkriptionspuffer gewaschen. Überstand, Waschschritte und Präzipitat wurden mit SDS/ProteinaseK Puffer versehen und dann nach 2.7.3. die RNA aufgearbeitet und mittels denaturierendem Harnstoffgel und Autoradiographie (2.3.2., 2.9.1.) analysiert. Zur Kontrolle der Depletionseffizienz wurden identische Proben entsprechend behandelt und die Überstände auf ein SDS Gel (2.3.5.) aufgetragen. Das Gel wurde einer Western Blot Analyse unterzogen (2.6.13.) Aus dem Unterschied der La Konzentration in den Überständen im Vergleich zu nicht behandelten Transkriptionsansätzen wurde die Depletionseffizienz ermittelt. Sie betrug bei allen Proben, auch wenn 60 ng rekombinantes La hinzugegeben wurde > 85%. Scheindepletion mit ProteinA Sepharose alleine zeigte hingegen keine Abnahme der La Konzentration.

2.6.13. Immunodetektion von Proteinen (Western-Blot)

Bei diesem Verfahren werden Proteine zunächst gelelektrophoretisch nach Größe getrennt (s. 2.3.5.). Anschließend werden die Proteine aus der Gelmatrix auf PVDF-Trägermembran (Immobilon-P Transfermembran) übertragen und dort immobilisiert. In einem weiteren Schritt können bestimmte Proteine durch Reaktion mit Antikörpern detektiert werden.

2.6.13.1 Transfer elektrophoretisch getrennter Proteine auf PVDF-Transfermembran**Materialien:**

Transfermembran	Immobilon -P-Transfermembran
Kathodenlösung:	25 mM Tris; 40 mM 6- Aminohexan; 20% (v/v) Methanol
Anodenlösung I:	30 mM Tris; 20% (v/v) Methanol
Anodenlösung II:	300 mM Tris; 20% (v/v) Methanol
Filterpapier:	Whatman 17CHR
Ponceau- Färber:	0,2 % (w/v) Ponceau S in 3% TCA
PBS	150 mM NaCl; 16 mM NaH ₂ PO ₄ ; 4 mM Na ₂ HPO ₄
PBS/Tween-Puffer	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS

Durchführung:

Die nach 2.3.5. über SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden in einem "semi-dry-Blotting" Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Transfermembran übertragen. Die Transfermembran muss vor Gebrauch 15 Sekunden in 100% Methanol und anschließend 2 Minuten in A.bid. geschwenkt werden. Anschließend wurde sie 15 Minuten in Anodenlösung I äquilibriert. Dann wurden auf die Graphitkathode der

Blotapparatur zunächst zwei auf Gelgröße zurechtgeschnittene, in Kathodenlösung getränkte Filterpapiere und anschließend das für ca. 15 Minuten in Kathodenlösung getränkte Gel blasenfrei aufgelegt. Darauf wurden in jeweils identischen Größen die Transfermembran und zwei Filterpapiere, welche vorher in Anodenlösung I getränkt worden sind, gelegt. Zum Abschluss wurden 2 weitere Whatman-Filterpapiere mit Anodenlösung II benetzt, blasenfrei aufgelegt und durch die Graphit-Anode komplettiert. Der Proteintransfer erfolgte ca. 2 Stunden bei 1 mA/cm^2 Gelfläche. Anschließend wurde die Bloteffizienz durch reversible Anfärbung der Proteine mit Ponceau-Lösung überprüft und mit dem Coomassie-Blue gefärbten Gel verglichen. Die Bahnen sowie die Größenstandards wurden auf der Membran mit einem Kugelschreiber markiert. Anschließend wurde die vollständige Entfärbung der rotgefärbten Proteinbanden durch Waschen der Membran mit PBS/Tween-Puffer erreicht.

Sollte die optimale Konzentration einer der Antikörper bestimmt werden, wurde ein „Streifenblot“ erstellt. Ein präparatives SDS-Gel mit nur einer präparativen Tasche und einer Testfraktion wurde wie üblich geblottet. Nach der Ponceaufärbung wurde die Membran in vertikale Streifen von 3 mm Breite geschnitten. Die Streifen wurden separat in Streifenkammern gelegt und dann wie üblich (2.6.13.2.) geblockt und anschließend mit unterschiedlichen Verdünnungen des zu testenden Antikörpers inkubiert.

2.6.13.2. Nachweis spezifischer Proteine durch Antigen-Antikörper-Wechselwirkung

Materialien:

PBS:	150 mM NaCl; 16 mM NaH_2PO_4 ; 4 mM Na_2HPO_4
PBS/ Tween:	0,05% (v/v) Tween 20 in PBS
Blockierungslösung:	10 % Magermilchpulver in PBS/ Tween 20
„Zweiter“- Antikörper:	Anti-Maus Ig, markiert mit ^{125}I (100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) in Blockierungslösung gelöst (0,6-1,2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$); oder: Anti-Maus Ig, gekoppelt mit Meerrettich Peroxidase (1:2000) in Blockierungslösung
„Erster“- Antikörper:	Je nach Bedarf, in Blockierungslösung gelöst
ECL Western blotting detection reagents	

Durchführung:

Zur Absättigung der auf der Transfermembran vorhandenen Proteinbindungsstellen wurden die geblotteten Membranen 60 Minuten in Blockierungslösung inkubiert. Danach wurde die Membran mit einer entsprechenden Verdünnung des ersten Antikörpers bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde die Membran 3 x (je 10 Minuten) mit PBS/ Tween-Puffer gewaschen und dann bei RT zwei Stunden mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen in jeweils PBS/Tween und PBS-Puffer (je 10 Minuten) wurde die Membran im Falle des Iod-markierten Antikörpers 15 Sekunden in 100% Methanol geschwenkt und auf einem Whatman Papier getrocknet. Dann erfolgte der

Nachweis der spezifischen Antikörper-Antigen-Wechselwirkung durch Autoradiographie mit Verstärkerfolie (2.9.1) bzw. durch einen Phosphor Imager (2.9.3.).

Wurde der Peroxidase-gekoppelte Zweit-Antikörper verwendet, wurde die Membran nach dem letzten PBS-Waschschritt in 20 ml nach Vorschrift des Herstellers gemischter ECI Lösung überführt, 1 bis 2 Minuten inkubiert, mit einer Folie überzogen und ohne Verstärkerfolie autoradiographiert. Die Expositionsdauer betrug zwischen 10 Sekunden und 30 Minuten.

2.6.14. Konzentrieren von Proteinlösungen für SDS-Gel-Elektrophorese mit Strataclean™ Resin

Diese Methode wurde zur Abtrennung von Proteinen (z.B. Restriktionsenzymen) von DNA entwickelt, kann aber auch zur Konzentrierung von Proteinfractionen benutzt werden. Es weist bei neutralem pH eine extrem hohe Affinität zu Proteinen und eine extrem geringe Affinität zu Nukleinsäuren auf.

Im vorliegenden Fall wurden gesammelte Fraktionen aus Glyzeringradienten, auf die Transkriptionskomplexe aufgetragen wurden (2.6.7.), auf diese Weise konzentriert, um Western-Blot Analysen (2.6.13.) durchzuführen. 10 µl (50% w/v) Stratagene Resin binden 5µg BSA quantitativ (Tiefenbach, 1998).

Materialien:

Strataclean Resin Silica Partikel	(ca. 50 w/v)
-----------------------------------	--------------

Durchführung:

Die Fraktionen wurden mit 10-25 µl Strataclean Resin versetzt und bei RT für 2 Stunden um die Querachse rotierend inkubiert. Danach wurde der Überstand bis auf ein geringes Restvolumen abgenommen und auf ein Kontroll SDS-Gel aufgetragen und Coomassie- und Silbergefärbt (2.3.5., 2.6.15., 2.6.16.). Das Präzipitat wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und ebenfalls auf ein SDS-Gel aufgetragen. Durch den Stromfluss wurden die Proteine vom Resin elektroeluiert und liefen ins Gel ein.

2.6.15. Anfärben von Proteinen mit Coomassie Brilliant Blue

Materialien:

Färbelösung:	0,15% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250; 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
Entfärber:	30% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

Durchführung:

SDS-Gele wurden durch Schütteln in Färbelösung 15 bis 60 Minuten gefärbt und anschließend im Entfärber entfärbt. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert.

2.6.16. Silberfärbung von Proteingelen nach Blum et al., 1987

Diese Färbung wurde in der Regel im Anschluss an eine Coomassiefärbung durchgeführt. Die Fixierungslösung entfärbt die Coomassie-gefärbten Proteine vollständig.

Materialien:

Fixierungslösung:	50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure
Lösung 1:	50% (v/v) Ethanol
Lösung 2:	30% (v/v) Ethanol
Lösung 3:	0,8 mM Na ₂ S ₂ O ₃
Silberfärbelösung:	2 g/l AgNO ₃ ; 0,026% Formaldehyd
Entwickler:	60 g/l Na ₂ CO ₃ ; 0,0185% Formaldehyd, 16 µM Na ₂ S ₂ O ₃
A. bid.	

Durchführung:

Das (Coomassie-gefärbte) Gel wurde mindestens o/n, besser 24 Stunden in Fixierungslösung inkubiert, um die Proteine im Gel zu fixieren. Danach wurde 2 x in Lösung 1 und 1 x in Lösung 2 für je 20 Minuten gewaschen. Das Gel wurde dann für genau 60 sec in Lösung 3 inkubiert und sofort danach in A. bid 3 x 20 Minuten gewaschen. Danach wurde die Entwicklerlösung zum Gel gegeben und solange inkubiert, bis eine optimale Färbung erreicht war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2 x in A. bid für 20 Minuten gewaschen und anschließend das Gel wieder in die Fixierungslösung gegeben. Das Gel wurde zur Dokumentation photographiert. Dies musste rasch passieren, da nach 2 bis 3 Stunden Flecken auf dem Gel auftraten.

2.7. *In vitro* Transkription

2.7.1. Spezifische *in vitro* Transkription

Die zellfreie spezifische *in vitro* Transkription an klonierten Genen stellt ein Testsystem zum Nachweis und zur Charakterisierung von Transkriptionskomponenten dar. Zudem ermöglicht sie die Analyse der Abfolge einzelner Abschnitte des Transkriptionszyklus *in vitro*. Ein Transkriptionsansatz enthielt alle notwendigen Proteinkomponenten (Polymerasen, Transkriptionsfaktoren), Matrizen-DNA sowie Nukleotide. Die radioaktive Markierung der synthetisierten RNA erfolgt durch Einbau von (⁻³²P)GTP in die wachsende RNA-Kette.

Materialien:

Transkriptionspuffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glycerin; 60 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF
EDTA	5 mM
Plasmid-DNA	1 µg/µl
Fragment-DNA	100 ng/µl

Heparin	10 mg/ml
Proteinase-K Mix:	0,4 mg/ml Proteinase K; 100 mM Tris/HCl, pH 7,9; 20 mM EDTA; 2% SDS; 0,2 mg/ml tRNA
NTP-Mix für Pol III	10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM UTP und 0,5 mM GTP in 67 mM Tris, pH 7,9
ATP; CTP; GTP; UTP	jeweils 10 mM; 67 mM Tris, pH 7,9 (getrennt angesetzt)
(³² P)-GTP	10 µCi/µl
RNAse Block Ribonuclease Inhibitor	40 U/µl

Ein typischer (³²P)-GTP markierter Transkriptionsansatz enthielt:

NTP Mix für Pol III	5 µl
(³² P)-GTP	0,3 µl
Plasmid-DNA bzw. Fragment-DNA	1 µl
EDTA	1 µl
RNAse Block	0,5-1 µl
Transkriptionspuffer	ad. 60-70 µl

Durchführung:

a) Reaktion ohne Präinkubation „Standard-Transkription“

Zunächst wurden die Reaktionsansätze im Eiswasserbad bei 0°C erstellt, das Volumen betrug, sofern nicht anders angegeben, 60 oder 70 µl. Proteinfractionen, DNA, Nukleotide, EDTA RNAse Block und Puffer wurden zusammengegeben und anschließend bei 30°C für 90 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Zugabe von Proteinase-K Mix ad. 100 µl Gesamtvolumen. Danach wurde der Ansatz mindestens 15 min bei RT weiterinkubiert. Anschließend wurde die synthetisierte RNA isoliert (2.7.3.), gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.3.2.) Das Gel wurde autoradiographiert (2.9.1.) und die erhaltenen Signale durch einen Phosphor Imager quantifiziert (2.9.3.).

b) Reaktion mit Präinkubation zur Komplexassemblierung

Sollte die Assemblierung der Transkriptionskomplexe zeitlich getrennt vor der RNA Synthese ablaufen, wurde zunächst nur DNA, EDTA sowie die Proteinfractionen zusammengegeben und 25 Minuten (VAI) bzw. 45 Minuten (5S) bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Nukleotide samt des (³²P)GTP hinzugegeben und i.d.R. 90 Minuten weiterinkubiert. Sollten die Komplexe während der Vorinkubation bereits die RNA initiiert haben, aber kurz nach dem Beginn arretiert werden (nur bei VAI möglich), wurden ATP, CTP und GTP, nicht aber UTP während der Vorinkubation mitinkubiert.

Sollten die assemblierten Komplexe nach der Vorinkubation unter „Single Round“-Bedingungen transkribieren, wurden Reinitiationen durch Zugabe von 600 µg/ml (VAI) bzw. 300 µg/ml (5S) Heparin nach der Vorinkubation ausgeschlossen.

Wurde eine Kinetik der RNA Synthese nach erfolgter Vorinkubation aufgenommen, wurden die Nachinkubation durch Zugabe der fehlenden Nukleotide zeitversetzt alle

20 sec (bzw. des fehlenden UTPs) gestartet und exakt nach der angegebenen Zeit durch Zugabe der ProteinaseK/SDS Lösung wieder abgestoppt.

„Pulse Chase“-Experimente wurden durchgeführt, indem nach erfolgter Vorinkubation mit ATP, CTP und GTP sowie (^{32}P)GTP an VAI die arretierten Transkriptionskomplexe (deren 6 nt RNA bereits radioaktiv markiert war) durch Zugabe von GTP und UTP (ad 1 mM Endkonzentration) ihre RNA zu Ende synthetisieren konnten. Da kein Heparin zugegeben wurde, waren Reinitiationen weiterhin möglich. Die nach diesem Zeitpunkt reinitiierten Ketten blieben dabei praktisch unmarkiert, da das überschüssige GTP eine effiziente Markierung durch (^{32}P)GTP verhinderte.

2.7.2. Transkription an immobilisierten DNA-Matrizen

Diese Methode ist eine *in vitro* Transkription, bei der im Gegensatz zur einfachen *in vitro* Transkription die DNA nicht frei in Lösung vorliegt, sondern an eine feste Matrix gekoppelt ist. Als Kopplungsmethode wurde die extrem starke Interaktion von Biotin an Neutravidin gewählt. Dabei trägt die Matrix (Beads) das Neutravidin, während das Biotin endständig kovalent mit der DNA verbunden ist. Diese Methode ermöglicht es, einer Affinitätschromatographie vergleichbar, assemblierte Transkriptionskomplexe von nicht inkorporierten Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen abzutrennen und Transkriptionskomplexe auf diese Weise zu reinigen.

2.7.2.1. Kopplung der DNA

Materialien:

biotinylierter M13 reversed sequencing Primer (17mer)	
nicht biotinylierter M13 sequencing Primer (17mer)	
Matrix	UltraLink Immobilized NeutrAvidin Plus
Blockierungslösung	0,2 mg/ml BSA in Transkriptionspuffer
1 x TBS Puffer	25 mM Tris; 150 mM NaCl, pH 7,2

Die Fragment-DNA wurde mittels PCR (2.2.14.) synthetisiert. Als spezifische Primer wurde ein M13 sequencing Primer und ein entständig biotinylierter M13 reversed sequencing primer verwendet, die beide komplementär zum pBluescript Vektor sind. Im Falle der pBEhe5S wt / DBox Plasmide entsteht ein 440 Basen Fragment, wobei die entständige Biotinmarkierung stromabwärts vom Terminator liegt.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden auf ihre Konzentration auf einem 5% PAA-Gel (2.3.3.) überprüft. Die Kopplung der DNA an die Neutravidin-Beads erfolgte in 1 x TBS in einem 2 ml Reaktionsfaß bei ständiger Rotation um die Querachse über Nacht. Mittels einer quantitativen Analyse der DNA Lösung und des Überstandes nach der Kopplung auf einem 5%igen PAA wurde die Kopplungseffizienz bestimmt. Sie lag jeweils bei ca. 10 ng / μl Suspension (ca. 50% w/v). Anschließend wurden die Beads in Blockierungslösung überführt (ca. 50% w/v). Die so vorliegenden gekoppelten Beads waren mit ca. 10 ng DNA-Fragment pro μl Suspension gekoppelt.

2.7.2.2. Transkription an immobilisierter Matrice

Materialien:

gekoppelte DNA-Matrice	siehe 2.7.2.1.
sonstige Materialien	siehe 2.7.1.

Durchführung:

ohne Waschen der Transkriptionskomplexe

Vor Gebrauch wurden die Beads einmal mit Transkriptionspuffer gewaschen. Dann wurden die Proteinfractionen, Nukleotide sowie ($-^{32}\text{P}$)GTP, RNase Block und EDTA analog zur Standardtranskription (2.7.1.) hinzugegeben. Die Transkription wurde 90 Minuten inkubiert, dabei wurden die Beads alle 10 Minuten resuspendiert. Die Transkription wurde durch ProteinaseK/SDS Lösung beendet. Die Überstände der Beads wurden abgenommen und die RNA präpariert (2.7.3.).

mit Waschen der Transkriptionskomplexe nach erfolgter Komplexassemblierung

Die Beads wurden mit den Proteinfractionen, aber ohne Nukleotide zunächst 45 Minuten inkubiert, um die Komplexe zu assemblieren. Alle 10 Minuten wurden die Ansätze resuspendiert. Dann wurden die Beads abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und verworfen. Die Beads wurden 2 x mit Transkriptionspuffer gewaschen und erneut in Transkriptionspuffer aufgenommen. Danach erfolgte die Transkription durch Zugabe von Nukleotiden, EDTA, RNase Block und ($-^{32}\text{P}$)GTP. Erneut wurden die Ansätze alle 10 Minuten resuspendiert. Die Transkription wurde nach 90 Minuten durch Zugabe der ProteinaseK/SDS Lösung beendet. Die Überstände der Beads wurden abgenommen und die RNA präpariert (2.7.3.).

2.7.2.3. Elution der Komponenten assemblierter Transkriptionskomplexe

Materialien:

Neutravidin-VAI oder 5S-Suspension	50% w/v in 1 x Transkriptionspuffer (10 ng DNA / μl):
Micro Spin Säule	Mobicol 35 μm
Blockierungslösung:	0,2 mg/ml BSA in Transkriptionspuffer
Glyzerinkissen:	Transkriptionspuffer mit 30% Glyzerin
Elutionspuffer:	Transkriptionspuffer, 1 M KCl
Transkriptionspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glyzerin; 60 mM KCl; 5 mM MgCl_2 ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF
Transkriptionspuffer KCl	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glyzerin; 5 mM MgCl_2 ; 3 mM DTT; 0,2 mM PMSF
EDTA	5 mM

Ein typischer Master-Mix Ansatz bestand aus:

PCB:	7,5 µl pro Probe
PCC:	20 µl pro Probe
PCAD (bei 5S-Matrizen):	10 µl pro Probe
Neutravidin-VAI oder 5S-Suspension (10 ng DNA /µl):	15 µl pro Probe
EDTA (5 mM):	1 µl pro Probe
Transkriptionspuffer:	ad 60 µl pro Probe

Durchführung:

Um die Zusammensetzung von assemblierten Transkriptionskomplexen zu analysieren, wurden zunächst Transkriptionskomplexe in größerem Maßstab („Master Mix“, für ca. 20 bis 30 Proben à 60µl assembliert. Dazu wurden PCB, PCC und im Falle des 5S Gens PCAD in optimaler Stöchiometrie mit der immobilisierten DNA-Bead Suspension in einem 2 ml Reaktionsgefäß 60 Minuten bei 30°C inkubiert, wobei alle 10 Minuten das Material mit einer Pipette resuspendiert wurde. Danach wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Sediment wurde in Blockierungslösung aufgenommen und auf eine mit Blockierungslösung behandelte unten verschlossene Mikrospin-Säule aufgetragen, die ein 300 µl 30% Glyzerinkissen beinhaltete. Das Neutravidinmaterial wurde durch kurze Zentrifugation bei 3000 U/min durch das Kissen befördert, während uninkorporiertes Protein nicht in das Kissen einlaufen konnte. Danach wurde der Proteinüberstand und das Glyzerinkissen quantitativ entfernt. Das Sediment wurde 2 x in Blockierungslösung gewaschen, um noch verbleibende nicht gebundene Proteine zu minimieren. Anschließend wurden die Transkriptionskomplexe mit 140 µl Elutionspuffer von der DNA eluiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Das Sediment wurde in 100 µl Transkriptionspuffer KCl resuspendiert, die Mikrospin-Säule unten geöffnet und kurz zentrifugiert. Die Beads blieben in der Säule. Der zentrifugierte Puffer wurde mit dem Eluat vereinigt. Hiervon wurden 5-10 µl für eine Transkriptionsprobe verwendet.

2.7.3. Aufarbeitung von RNA aus *in vitro* Transkriptions- und Immunopräzipitationsansätzen

Materialien:

PCI:	Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (50/50/1)
Denaturierungslösung:	0,2% Bromphenolblau; 0,2% Xylencyanol in 80% (v/v) Formamid
Natriumacetat-Lösung:	0,6 M Natriumacetat, pH 5,5
Glykogen.	20 mg/ml
Ethanol.	100%
CIP:	siehe 2.2.8.
10 x CIP-Puffer.	siehe 2.2.8.

Durchführung:

Der die *in vitro* synthetisierte RNA (3.7.1, 3.7.2.) bzw immunopräzipitierte RNA-La Komplexe (2.6.12.) enthaltene und mit ProteinaseK/SDS behandelte Ansatz wurde

mit einem Volumenteil Natriumacetatlösung versehen, um die Fällung der Nukleinsäuren vorzubereiten. Als Fällungshilfe wurde in einigen Fällen 0,5 µl Glykogen pro Probe zugesetzt. Die tRNA im ProteinaseK/SDS Gemisch fungierte als weitere Fällungshilfe. Dann wurde 1VT PCI hinzugegeben, um Proteine und deren Abbauprodukte abzutrennen. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 UpM wurde die wässrige Phase abgezogen und in 2,5 VT 100% Ethanol überführt. Die Pelletierung der RNA erfolgte durch 15 minütige Zentrifugation bei 13000 UpM. Nach dem Abziehen des Ethanols wurde das Sediment in 6-8 µl Denaturierungslösung aufgenommen und 15-20 Minuten bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 95°C denaturiert, im Eiswasserbad abgekühlt und auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen (2.3.2.). Die Analyse des Gels erfolgte durch Autoradiographie (2.9.1.) und gegebenenfalls auch durch Auswertung am Phosphor Imager (2.9.3.).

Bei Experimenten mit Vorinkubation am VAI-Gen, bei denen ein 6 nt Transkript nachgewiesen werden sollte, musste die Aufarbeitung modifiziert werden, da die Strahlung der Nukleotide die sehr kurzen Transkripte auf dem Röntgenfilm überdeckte. Nach der ersten Fällung wurden die Proben nicht in Denaturierungslösung aufgenommen, sondern mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt (siehe auch 2.2.8.), um die nicht-inkorporierten (-32P)GTP-Moleküle zu dephosphorylieren.

10 x CIP-Puffer	4µl
CIP (1 U/µl)	4µl
H ₂ O	ad 40µl

Das trockene Pellet wurde in Dephosphorylierungsgemisch aufgenommen und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA erneut mit PCI extrahiert, unter Standardbedingungen (2.2.3.) gefällt und in Denaturierungslösung überführt.

2.7.4. Unspezifische *in vitro* Transkription („Polymerase-Test“)

RNA Polymerasen sind in der Lage, ohne Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an jeder beliebigen Stelle mit der Matrizen-DNA zu assemblieren und die RNA-Synthese zu initiieren. Als Matrizen-DNA wurde poly[dAdT] verwendet. Die unspezifische Transkription ist ein geeignetes Hilfsmittel, um Polymeraseaktivitäten in gereinigten Proteinfractionen nachzuweisen.

Materialien:

poly[dAdT]	0,7 µg/µl
MnCl ₂	40 mM
Transkriptionspuffer	20 mM Tris/HCl, pH 7,9; 10% (v/v) Glyzerin; 60 mM oder 0 M KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0,2 mM PMSF
ATP/UTP Mix	5 mM ATP, 0,1 mM UTP in 0,5 M HEPES, pH 7,9
KCl	1 M; 0,5 M
-Amanitin	10mg/ml; 0,1mg/ml
DE81-Membran	
Waschlösung	5% (w/v) Na ₂ HPO ₄

Durchführung:

Reaktionsansätze wurden im Eiswasserbad bei 0°C erstellt, das Volumen betrug 34 µl. Die Ansätze enthielten 3-6 µl Proteinfraction, ggf. Inhibitorlösung (-Amanitin) und Transkriptionspuffer ad. 17 µl. In allen Ansätze wurde die KCl-Konzentration ggf. durch Einsatz von 0 M KCl Transkriptionspuffer bzw. Zugabe von KCl auf 60-80 mM KCl eingestellt. So konnten auch Fraktionen mit hohen KCl-Konzentrationen ohne Dialyse getestet werden. Wurden Inhibitoren eingesetzt, wurden die Ansätze bei 0°C 15 min. vorinkubiert. Das Volumen der Inhibitorlösung wurde in den Kontrollen mit A. bid. ausgeglichen.

Ein typischer Reaktionsmix enthielt:

3,4 µl ATP/UTP-Mix
1,7 µl MnCl ₂
0,7 µl poly[dAdT]
1,7-2,5µCi ³² P-UTP
A. bid. ad 17 µl

Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe des Reaktionsmixes. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für 30 Minuten. Die Reaktion wurde abgestoppt durch Auftropfen von 30 µl des Reaktionsansatzes auf ein vorbeschriftetes Feld (2,1 x 2,1cm) der DE81-Membran. Die freien Nukleotide wurden von der Membran durch fünfmaliges Waschen mit 5%igem Na₂HPO₄-Puffer entfernt. Phosphatreste wurden durch Wässern der Membran abgewaschen und die Membran anschließend mit Alkohol (100%) behandelt und getrocknet. Die Membran wurde autoradiographiert (2.9.1.), um zu überprüfen, ob die freien Nukleotide vollständig entfernt waren. Eine mangelhafte Entfernung (bedingt durch zu lang gewählte Zeiträume zwischen Auftropfen und Waschen) äußerte sich in „schwarzen Rändern“ auf der Autoradiographie. Anschließend wurden die Felder der Membran ausgeschnitten und mit Szintillationscocktail (Rotiszint) versehen. Die quantitative Auswertung der Radioaktivität erfolgte durch Szintillationsmessung (2.9.2.).

2.8. Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen**2.8.1. „Electrophoretic Mobility Shift Assay“ (EMSA)**

Diese Methode zum Nachweis von Protein-DNA Interaktionen (nach Strauss und Varshavsky, 1984) beruht auf der veränderten elektrophoretischen Mobilität eines Komplexes eines bestimmten Proteins mit einem radioaktiv markiertem DNA-Fragment im Vergleich zu dem nicht komplexierten DNA-Fragment („Freie Probe“).

Materialien:

poly-(dIdC)	1 mg/ml
-markiertes DNA-Fragmente	XhoI/BamHI-Fragmente aus pBEhe5S wt
pUC 9	1 mg/ml
Proteinfractionen	

Transkriptionspuffer	siehe 2.7.1.
----------------------	--------------

Durchführung:

Ein 25 µl EMSA-Ansatz in Transkriptionspuffer enthielt 0,5-4 µg pUC 9 und 0,5-4 µg poly-(dIdC) als Kompetitor DNA. Als spezifisches Fragment wurde das BamHI/XhoI Fragment aus pBEhe5S wt verwendet, das vorher nach 2.2.15. radioaktiv markiert wurde. Hiervon wurden ca. 10000 CPM pro Probe eingesetzt. Zunächst erfolgte eine Inkubation der Proteinfractionen (S100, PCA, PCB, PCC, PCD und PCAD) mit der Kompetitor-DNA bei 30°C für 15 Minuten. Danach wurde mit der radioaktiv markierten spezifischen DNA weitere 90 Minuten weiterinkubiert. Dann wurden die Ansätze auf Eis gestellt und bei 4°C auf ein PAA-Gel für native Protein-DNA-Komplexe aufgetragen (2.3.4.).

2.8.2. EMSA an einzelsträngiger DNA (Oligonukleotiden)

Um Interaktionen von Proteinen mit Einzelstrang-DNA nachzuweisen, wurden Oligonukleotide verwendet, die die zu untersuchende Zielsequenz oder unspezifische Sequenzen trugen.

Materialien:

Oligonukleotide, -markiert, oder unmarkiert als Kompetitor	5S D-Box-Primer wt kodierender (-) Strang 5S D-Box-Primer D-Box kodierender (-) Strang 5S D-Box-Primer wt nicht-kodierender (+) Strang 5S D-Box-Primer D-Box nicht-kodierender (-) Strang M13 sequencing Primer (24mer) M13 reversed sequencing Primer (24mer)
pUC 9	1 µg/µl
poly-(dIdC)	1 µg/ µl
Transkriptionspuffer	siehe 2.7.1.

Durchführung:

Der Einzelstrang-EMSA erfolgte alternativ an allen sechs Oligonukleotiden. Es wurden jeweils 1×10^5 CPM des jeweiligen -markierten Oligonukleotids eingesetzt. Das Volumen eines EMSA-Ansatzes in Transkriptionspuffer betrug 30 µl. Zunächst erfolgte eine Inkubation der Proteinfractionen (S100, PCA, PCB, PCC, PCD und PCAD) mit Kompetitor-DNA (2 µg pUC 9 und 4 µg poly-(dIdC)) für unspezifisch Nukleinsäure-bindende Proteine bei 30°C für 20 Minuten. Zur weiteren Überprüfung der Spezifität der Komplexe wurden in einigen Experimenten danach 0 bis 8 pmol unmarkierte Oligonukleotide als Kompetitor hinzugegeben und weitere 20 Minuten inkubiert. Danach wurde mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid weitere 60 Minuten inkubiert. Dann wurden die Ansätze auf Eis gestellt und bei 4°C auf ein PAA-Gel für native Protein-DNA-Komplexe aufgetragen (2.3.4.).

2.9. Bestimmung radioaktiver Strahlung

2.9.1. qualitativ durch Autoradiographie

Nach gelelektrophoretischer Trennung radioaktiv markierter Nukleinsäuren wurde das Gel oder die Membran mit handelsüblicher Frischhaltefolie überzogen (EMSA-Gele wurden nicht überzogen) und ein Röntgenfilm sowie eine Verstärkerfolie („intensifying screen“) aufgelegt. Der Film wurde in lichtundurchlässiger Verpackung 1-8 Tage bei -80°C exponiert. Nach Entwicklung und Fixierung des Films erscheinen die markierten RNA- bzw. DNA-Fragmente als geschwärzte Banden.

2.9.2. quantitativ durch Bestimmung der Szintillationsstrahlung

Angewandt wurde diese Methode zur Quantifizierung von DE81-Membranfeldern und zur Bestimmung der Markierungseffizienz von DNA-Fragmenten (2.2.15.). Hierzu wurde das Membranfeld bzw. ein Aliquot des markierten Fragmentes mit 5 ml Szintillationscocktail (Rotiszint) in ein Zählerröhrchen gegeben und in einem Beckman Szintillationszähler (LS 5000 TD) die Impulsrate pro Zeiteinheit in „counts per minute“ (cpm) bestimmt. Die Messung wurde je nach Signalstärke 2-4 mal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

2.9.3. qualitativ und quantitativ mittels Analyse durch einen Phosphor Imager

Mit Hilfe dieser Methode kann die Stärke der radioaktiven Strahlung der verschiedenen Proben in kurzer Zeit sehr exakt ermittelt werden. Vor dem Auflegen werden alte Daten, die noch auf der Imaging Plate (IP) gespeichert sind, in einem „Eraser“ gelöscht, und diese nun informationsleere IP auf das Gel aufgelegt. Die Expositionsdauer beträgt nur ca. $\frac{1}{10}$ der Zeit, die ein Röntgenfilm benötigt. Die IP wird nach der Exposition in einem Fuji FLA -3000 Fluorescent Image Analyzer / Phosphor Imager gescannt (mit dem Programm „Image Reader V. 1.7 E“), d. h. die genaue Signalstärke wird ermittelt. Die Auswertung der gespeicherten Daten erfolgt mit Hilfe eines Computers mit dem Programm „Science Lab 98, Image Gauge, Version 3.1“.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Phasen des humanen Transkriptionszyklus

Der humane Polymerase III Transkriptionskomplex wird durch das sukzessive Anlagern der Transkriptionsfaktoren an die Promotorelemente des Gens assembliert. Durch Assemblierung der Polymerase wird er vervollständigt und kann dann die Synthese der RNA einleiten. Nachdem die RNA fertiggestellt ist und am Terminator entlassen wird, wird die Polymerase erneut an den Initiator rekrutiert. Der Transkriptionsprozess wird daher unterschieden in die Abschnitte: Assemblierung des Komplexes, Initiation der RNA, Elongation der RNA, Termination und Reinitiation.

Da die Transkription offenbar in hohem Maße zyklisch abläuft, ist es nicht einfach, die unterschiedlichen Abschnitte getrennt voneinander zu untersuchen. Allerdings kann durch Zugabe von Heparin oder Sarkosyl in geeigneter Konzentration die Reinitiation verhindert werden, während eine bereits initiierte RNA bis zur vollen Länge synthetisiert wird. Ein solches Experiment wird als „Single Round“-Transkription bezeichnet (Kassavetis et al., 1990).

3.1.1. Arretierung und Reaktivierung von Transkriptionskomplexen zu Beginn der Elongationsphase

Das adenovirale VAI-Gen weist zu Beginn der kodierenden Sequenz folgende Basenabfolge im nicht-kodierenden Strang auf: GGGCACT. Daher sollte überprüft werden, ob es möglich ist, die RNA-Synthese nach sechs Nukleotiden anzuhalten, wenn kein UTP im Reaktionsansatz vorhanden ist, und die dabei entstehende RNA nachzuweisen. Wurde z.B. ein zytoplasmatischer Extrakt (S100) verwendet, war dies nicht möglich, da in solchen Extrakten eine signifikante Menge von endogenen Nukleotiden enthalten ist (Daten nicht gezeigt). Daher wurde überprüft, ob die Nukleotidkonzentration durch die nachfolgenden Chromatographieschritte soweit verringert wird, dass ohne zusätzlichen Einsatz von UTP nach sechs Basen arretierte Komplexe präparierbar sind. Getestet wurde sowohl ein System, bestehend aus den Phosphocellulosefraktionen PCB und PCC (Abb. 1, Bahnen 1-5) als auch ein rekonstituiertes Transkriptionssystem, bestehend aus Polymerase, TFIIB β , TFIIC1

und TFIIIC2 (Bahnen 6-10). Letztere Fraktionen waren entweder über zwei oder drei Säulen gereinigt worden (siehe 2.6.6.). Die Bahnen 1 und 6 zeigen jeweils Kontrollansätze, die mit dem Standard-Nukleotidgemisch durchgeführt wurden (siehe 2.7.1.). Zum Vergleich wurden in den Bahnen 2 und 7 entsprechende Ansätze inkubiert, wobei statt des Nukleotidgemisches einzeln angesetzte Nukleotide in der gleichen Stöchiometrie zusammengemischt wurden, um zu überprüfen, ob alle Nukleotide funktionell aktiv waren. Die Endkonzentration betrug in allen Fällen 1 mM ATP, CTP und ggf. UTP sowie 50 μ M GTP. In beiden Transkriptionssystemen konnte kein Unterschied in der Transkriptionseffizienz aufgrund der verwendeten Nukleotide festgestellt werden.

In den Bahnen 3, 4, 8 und 9 wurde jeweils UTP aus dem Reaktionsansatz weggelassen und die Reaktion für 90 Minuten (Bahnen 3 und 8) bzw. für 15 Minuten (Bahnen 4 und 9) inkubiert. Um zu überprüfen, ob in diesen 15 Minuten bereits Komplexe assembliert waren, wurde in den Bahnen 5 bzw. 10 jeweils für 5 Minuten mit UTP weiter inkubiert.

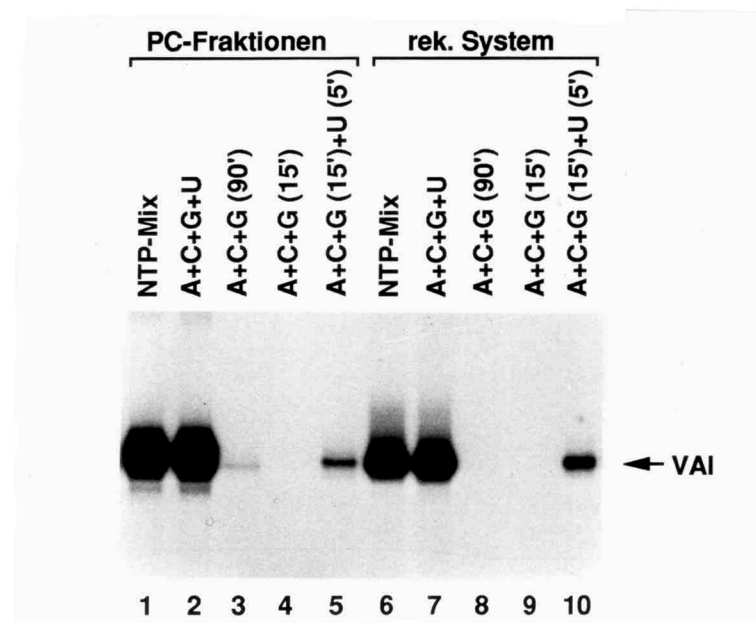


Abb.1: *In vitro* Transkription. Analyse des UTP-Gehalts in verschiedenen Rekonstitutionssystemen.

Zwei verschiedene Rekonstitutionssysteme wurden auf ihren Gehalt an UTP untersucht.

Bahnen 1-5: teilrekonstituiertes System aus 5 μ l PCB und 20 μ l PCC, Bahnen 6 bis 10: rekonstituiertes System aus 2,5 μ l TFIIIB β , 2 μ l Polymerase (jeweils SO_3^-), 10 μ l TFIIIC1 und 5 μ l TFIIIC2 (jeweils MQ). Bahnen 1 und 6: vorgefertigtes Nukleotidgemisch (Endkonzentration: 1 mM ATP, CTP, UTP und 50 μ M GTP), Inkubation für 90 Minuten, Bahnen 2 und 7: Gemisch aus einzeln angesetzten Nukleotiden, Inkubation für 90 Minuten, Bahnen 3 und 8: Inkubation ohne UTP für 90

Minuten, Bahnen 4 und 9: Inkubation ohne UTP für 15 Minuten, Bahnen 5 und 10: Inkubation ohne UTP für 15 Minuten, nach Zugabe von UTP weitere Inkubation für 5 Minuten bei 30°C.

Die Daten zeigen, dass im PCB/PCC-System nach 90 Minuten Inkubation ohne UTP ein sehr schwaches Transkript entsteht, was auf restliche UTP-Moleküle in den Fraktionen zurückzuführen ist (Bahn 3). Es konnte kein Transkript detektiert werden, wenn stattdessen das rekonstituierte Transkriptionssystem verwendet wurde (Bahn 8). Hingegen konnte nach 15 Minuten in beiden Systemen kein Volle-Länge-Produkt detektiert werden. Dies ist nicht darauf zurückzuführen, dass zu diesem Zeitpunkt die Komplexassemblierung noch nicht abgeschlossen war (wie auch Abb. 2 zeigt), da nach Zugabe von UTP bereits nach 5 Minuten eine größere Menge RNA erhalten wurde (Bahnen 5 und 10). Vielmehr konnten die bereits initiierten Komplexe aufgrund der geringen UTP-Konzentration die RNA nicht über das sechste Nukleotid hinaus verlängern.

Interessanterweise war die Transkriptmenge fünf Minuten nach der UTP-Zugabe im rekonstituierten System größer als im teilrekonstituierten System, obwohl die anderthalbstündige Kontrolltranskription im teilgereinigten System deutlich stärker ausfiel.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei Verwendung teilgereinigter Systeme ein Verhindern der Elongations/Reinitiationsphase durch Arretierung des Komplexes bei Nukleotid 6 weitgehend, im Falle eines rekonstituierten Systems vollständig erreicht werden kann.

In einem 6%igen denaturierenden PAA-Gel ist ein 6-Basen-Transkript nicht nachweisbar, da es sich von den vorauslaufenden Nukleotiden nicht trennt. Daher wurde versucht, das Transkript des arretierten Komplexes auf einem höherprozentigen Gel nachzuweisen. Allerdings konnte auch auf einem 20%igen Gel zunächst dieses Transkript nicht detektiert werden, da die sehr hohe Radioaktivität der nicht inkorporierten Nukleotide mögliche Transkripte, die kleiner als ca. 10 Nukleotide waren, überstrahlte (Daten nicht gezeigt). Dieses Problem konnte aber gelöst werden, indem die Transkriptionsproben nach der Aufarbeitung mit alkalischer Phosphatase behandelt wurden, um die Nukleotide enzymatisch abzubauen (2.7.3.). Anschließend wurden die Proben erneut phenolisiert und gefällt. Nach dieser Behandlung war es möglich, die RNA der arretierten Komplexe nachzuweisen.

Die Abb. 2 zeigt im linken Block eine Kinetik der Synthese des 6-nt-Transkripts. Die Transkription erfolgte unter Verwendung einer TFIIB β - und einer PCC-Fraktion

(EDF). Diese Proteinfractionen wurden zusammen mit ATP, CTP, GTP sowie (- ^{32}P)GTP unterschiedlich lange inkubiert.

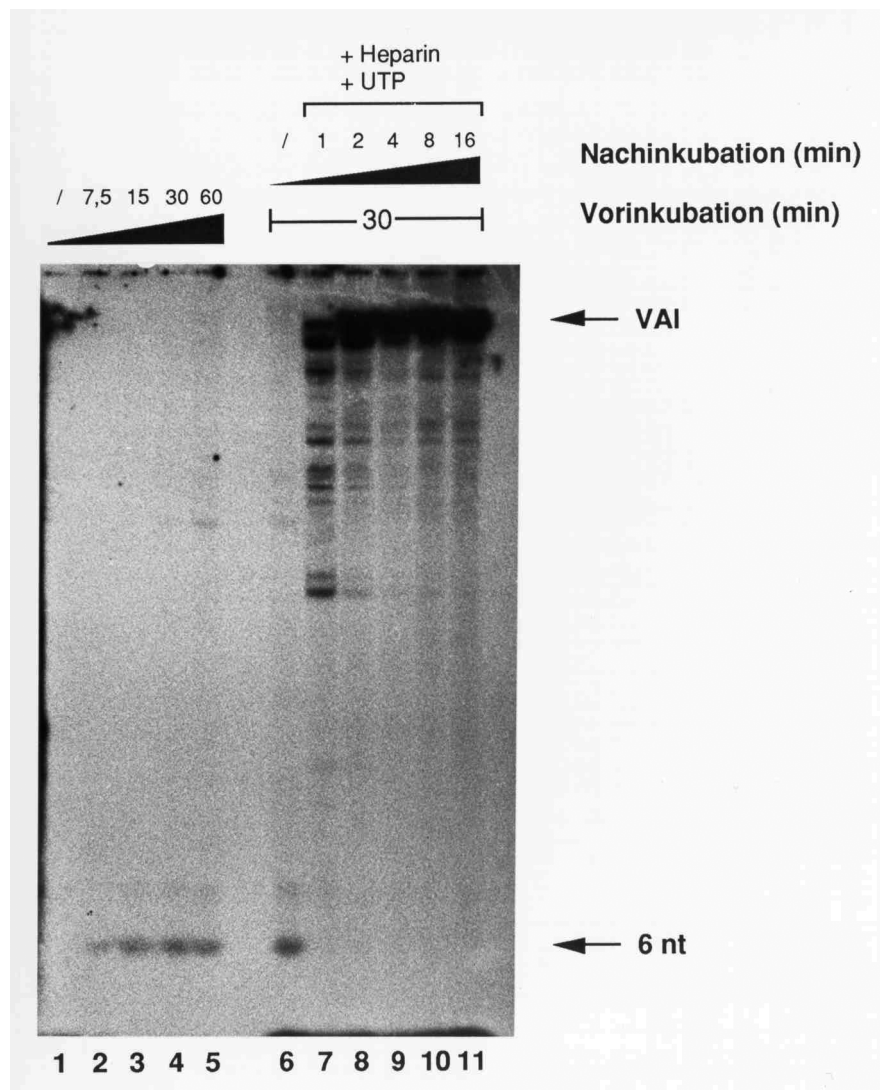


Abb. 2: *In vitro* Transkription. Der VAI-Transkriptionskomplex wird bei fehlendem UTP nach 6 Nukleotiden arretiert und kann durch Zugabe von UTP reaktiviert werden.

10 μl einer TFIIB β -Fraktion (EDF) sowie 20 μl einer PCC wurden mit 1 μg pUVAI, je 600 μM CTP und ATP, 10 μM GTP sowie 10 μCi (- ^{32}P)GTP unterschiedlich lange bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Transkription entweder abgestoppt (Bahnen 1-6), oder die Proben wurden nach Zugabe von UTP (Endkonzentration: 600 μM) unter „Single Round“-Bedingungen unterschiedlich lange bei 20°C weiter inkubiert. Nach der ersten Aufarbeitung der Proben wurde die RNA mit alkalischer Phosphatase behandelt und erneut aufgearbeitet (2.7.3.). Die RNA wurde auf einem 12%igen denaturierenden PAA-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie ausgewertet.

Bahnen 1 bis 5: Inkubation ohne UTP für 0, 7,5, 15, 30 und 60 Minuten, Bahnen 6 bis 11: Inkubation ohne UTP für 30 Minuten plus Nachinkubation für 0, 1, 2, 4, 8 und 16 Minuten.

Nach 7,5 Minuten (Bahn 2) war ein deutliches Transkript zu detektieren, das nach 15 Minuten bereits seine maximale Stärke aufwies (Bahn 3). Auch nach 60 Minuten sind die meisten RNAs nicht weiter verlängert worden. Da die Konzentration an endogenem UTP in dem verwendeten Rekonstitutionssystem zwar sehr gering, aber nicht ganz Null war, waren nach 60 Minuten auch einige längere Transkripte nachzuweisen (Bahn 5 und 6).

Im rechten Block wurde untersucht, ob die intermediären 6-nt-Transkripte durch nachträgliche Zugabe von UTP in Volle-Länge-Transkripte erweitert werden konnten, oder ob der Transkriptionskomplex durch die Arretierung aufgrund des UTP-Mangels seine Elongationskompetenz verloren hatte. Alle Ansätze wurden für 30 Minuten ohne UTP inkubiert und dann entweder durch Zugabe von ProteinaseK/SDS gestoppt (Bahn 6), oder es wurden UTP und Heparin zugegeben und die Reaktion unterschiedlich lange inkubiert. Das Heparin sorgte dafür, dass keine weiteren Initiations- oder Reinitiationsprozesse mehr möglich waren („Single Round“-Transkription, siehe 2.7.1.).

Bereits nach einer Minute ist das 6-nt-Transkript nicht mehr zu detektieren. Es wurde in eine ganze Reihe von unterschiedlich langen Transkripten und auch zum Teil bereits in das Volle-Länge-Transkript erweitert (Bahn 7). Nach etwa 4 Minuten sind weitestgehend alle RNA Stränge bis zum Terminator erweitert worden (Bahn 9).

Die intermediären Transkripte unterschiedlicher Länge stellen die RNAs von Transkriptionskomplexen dar, die während ihrer Synthese „pausierten“. Die Orte, an denen das Pausieren auftritt, werden „Pausing Sites“ genannt.

3.1.2. Während der Elongation der RNA-Synthese kommt es zu sequenzspezifischem Pausieren der Polymerase, welches weder auf niedrige Nukleotidkonzentrationen noch auf Heparin zurückzuführen ist

Mehrere Gründe für sequenzspezifische Pausierungen während der Elongationsphase sind denkbar. In Abb. 3 sollte untersucht werden, ob die Einwirkung des Heparins für die Pausierungen verantwortlich ist. Da in dem vorangegangenen Experiment die GTP-Konzentration lediglich bei 10 μ M lag, um eine möglichst effiziente spezifische radioaktive Markierung des 6-nt-Transkriptes zu ermöglichen, sollte außerdem überprüft werden, ob die Pausierungen auf einen bloßen Mangel an GTP zurückzuführen sind.

In Abb. 3 wurde eine „Single Round“-Transkription (linker Block) einem „Pulse Chase“-Experiment gegenübergestellt (rechter Block). In beiden Teilexperimenten wurde zunächst wieder das 6-nt-Transkript synthetisiert. Da auch in diesem Experiment während der Vorinkubation ($-^{32}\text{P}$)GTP im Ansatz enthalten war, wurde das 6-nt-Transkript radioaktiv markiert (Bahn 1 und 13). Dieses Transkript wurde dann in beiden Fällen durch Zugabe von UTP erweitert (Bahnen 2-12 und 14-24).

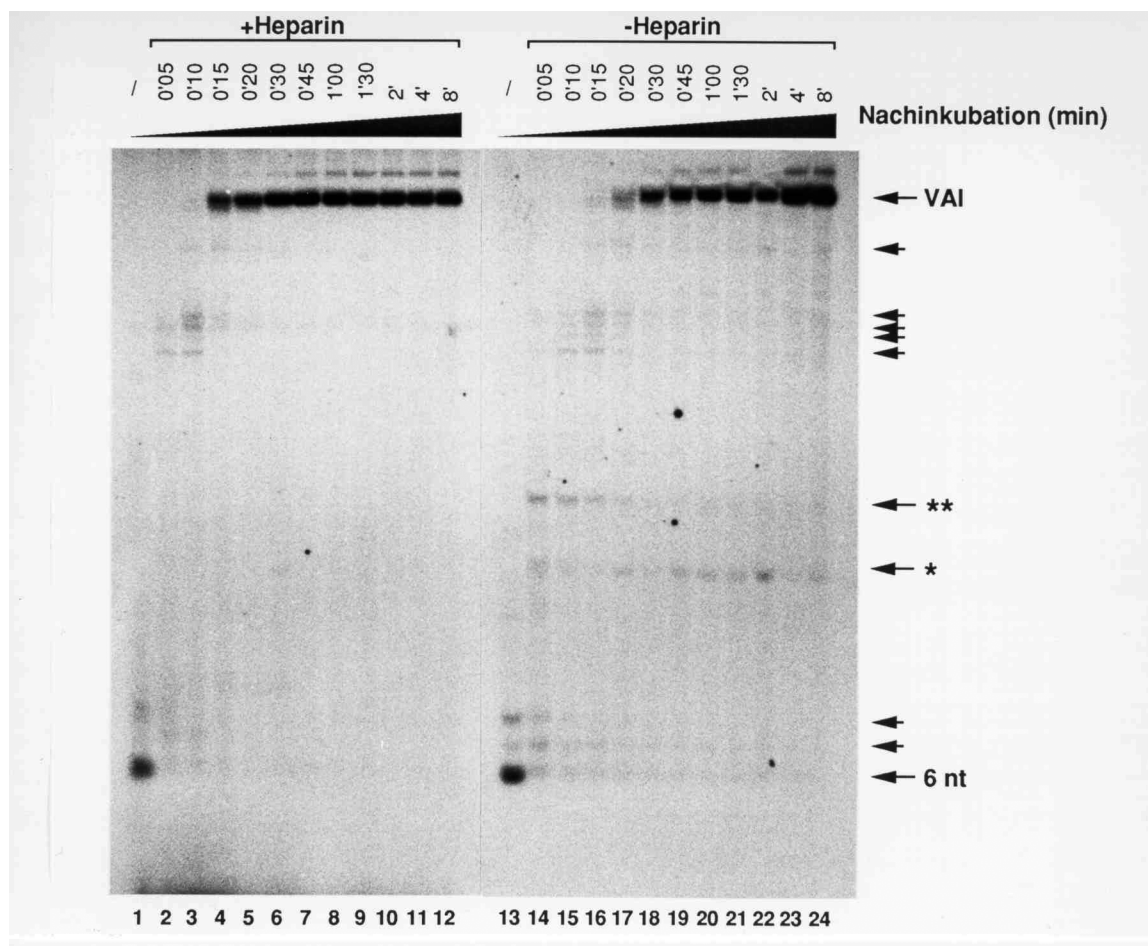


Abb. 3: *In vitro* Transkription. Prozessivität der RNA Polymerase während der Elongationsphase mit und ohne Heparin („Single Round“ vs. „Pulse Chase“)

10 μl einer TFIIB β -Fraktion (EDF) sowie 20 μl einer PCC wurden mit 1 μg pUVAI, je 600 μM CTP und ATP, 10 μM GTP sowie 10 μCi ($-^{32}\text{P}$)GTP für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Transkription entweder abgestoppt, oder die Proben wurden nach Zugabe von UTP (Endkonzentration: 600 μM) sowie GTP (Endkonzentration: 1,2 mM) unterschiedlich lange bei 20°C weiter inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie in Abb. 2.

Bahnen 1 bis 12: „Single Round“-Experiment mit Heparin nach der Vorinkubation, Bahnen 13 bis 24: „Pulse Chase“-Experiment ohne Heparin. Bahnen 1 und 13: nur Vorinkubation, Bahnen 2 bis 12 bzw. 14 bis 24: Nachinkubation für 0'05, 0'10, 0'15, 0'20, 0'30, 0'45, 1'00, 1'30, 2, 4, und 8 Minuten.

In der „Single Round“-Transkription (linker Block) wurde durch die Heparinzugabe nach der Vorinkubation nur eine Runde der Synthese erlaubt. Da zeitgleich mit UTP und Heparin auch ein Überschuss an unmarkiertem GTP zur Reaktion gegeben wurde, wurde die RNA während der weiteren Elongationsphase nicht mehr weiter markiert. Im „Pulse Chase“-Experiment (rechter Block) waren nach Beendigung der ersten Transkriptionsrunde Reinitiationsprozesse zugelassen, da kein Heparin zugefügt wurde. Da aber auch in diesem Telexperiment nach der Vorinkubation unmarkiertes GTP zugegeben wurde, wurden alle RNAs, die nach der ersten Runde der Transkription initiiert wurden, nicht oder nur geringfügig markiert.

Erneut sind in der „Single Round“-Transkription „Pausing Sites“ zu detektieren, wenngleich nicht so viele wie in Abb. 2. Diese geringere Anzahl ist entweder dadurch bedingt, dass durch die Beschränkung der Markierung auf die ersten 3 Guanosinreste in der RNA die Sensitivität des Experiments geringer ist, oder es ist auch möglich, dass ein Teil der Pausierungen in Abb. 2 auf die verhältnismäßig geringe GTP Konzentration (10 μ M) während der Elongationsphase zurückzuführen ist.

Nach 15 Sekunden (Bahn 4) waren bereits die meisten RNAs in Volle-Länge-Transkripte verlängert worden. Diese deutlich höhere Geschwindigkeit im Vergleich zu Abb. 2 ist auf die höhere GTP-Konzentration zurückzuführen. Im Vergleich dazu war die Synthesegeschwindigkeit im „Pulse Chase“ deutlich geringer. Erst nach 30 Sekunden sind die meisten Transkripte verlängert (Bahn 18). Dies ist vermutlich durch das Auftreten zweier zusätzlicher „Pausing Sites“ bedingt, die im „Single Round“-Experiment nicht erkennbar sind (markiert mit* und**). Das Pausieren an der *-Stelle führte offenbar bei einigen Transkriptionskomplexen sogar zum Syntheseabbruch, wobei das Transkript im Folgenden leicht verkürzt wurde.

Obwohl die Nukleotidkonzentration aller vier Nukleotide während der Elongationsphase hoch war, konnten in beiden Telexperimenten einige „Pausing Sites“ detektiert werden. Im „Pulse Chase“-Experiment ohne Heparin ergaben sich zusätzliche Pausierungen, die bei Verwendung von Heparin nicht auftraten. Somit sind zumindest die hier detektierten Pausierungen weder auf den Einfluss von Heparin noch auf eine geringe GTP-Konzentration zurückzuführen.

3.1.3. Rekonstituierte Pol III Transkriptionssysteme enthalten La in signifikanten Mengen

Die Elongationsphase der RNA wird beendet, wenn der ternäre Polymerase-DNA-RNA-Komplex den Terminator des Pol III Gens erreicht. Es handelt sich dabei um eine Abfolge von mindestens vier Thyminresten, im Falle des VAI-Gens besteht der Terminator aus der Sequenz: 5'-TTTTGGCTT-3'. Nachdem die ersten Thymine noch in Uracile umgeschrieben werden, bricht die Synthese dann ab, der ternäre Komplex löst sich auf, und die RNA wird entlassen. Sie trägt dann das typische (Oligo-U)-OH Ende der Pol III Transkripte.

Da das 50 kDa Phosphoprotein La als Terminations- und Reinitiationsfaktor beschrieben wurde, welcher u. a. benötigt werden soll, um die fertige RNA aus dem ternären Komplex freizusetzen, ließen diese möglichen Funktionen La als interessantes Objekt zur näheren Charakterisierung des Transkriptionszyklus erscheinen. Allerdings wurde in keinem der Labors, die mit gereinigten Transkriptionsfaktoren arbeiten, jemals ein Bedarf an La für die Transkription festgestellt. Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde zunächst untersucht, inwieweit ein rekonstituiertes Transkriptionssystem, wie es routinemäßig verwendet wird, La als Kreuzkontamination enthält.

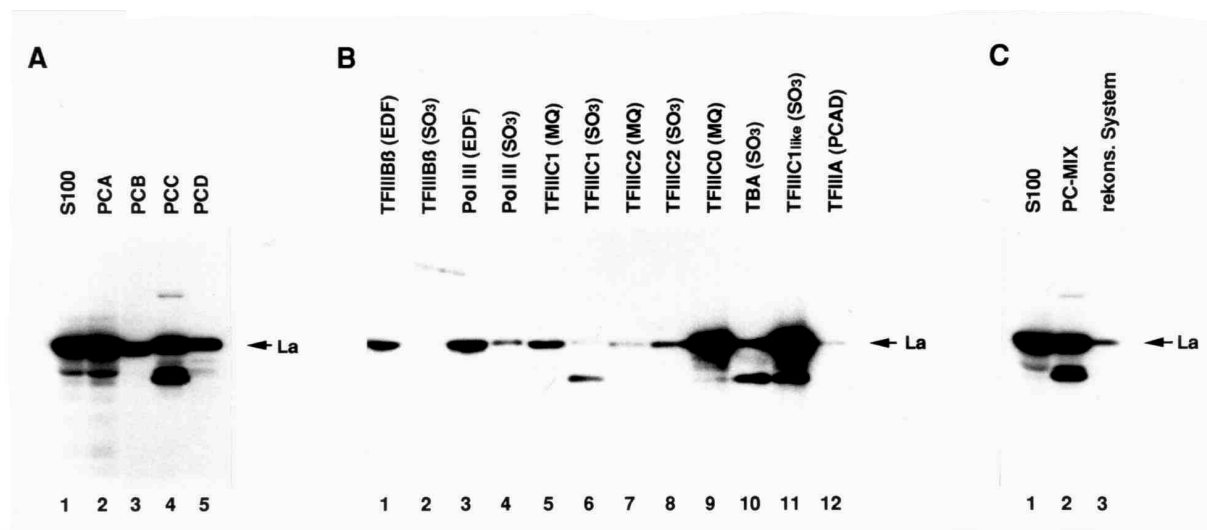


Abb. 4: Western Blot. Bestimmung des La-Gehaltes in Transkriptionsfaktor-haltigen Proteinfractionen verschiedener Reinigungsstufen

Verschiedene Fraktionen, die humane Transkriptionsfaktoren bzw. die RNA Polymerase III enthielten, wurden nach 2.3.5. auf ein 12,5%iges SDS Gel aufgetragen und auf eine Membran transferiert (siehe 2.6.13.1.). Die Membran wurde mit monoklonalen Antikörpern (SW5 und 3B9) gegen La inkubiert

(2.6.13.2.). Der Zweitantikörper war ^{125}I markiert und wurde mit 0,6 $\mu\text{Ci/ml}$ Milchpulver eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch Autoradiographie und durch einen Fuji FLA-3000.

A: Bahn 1: S100, Bahnen 2-5: Phosphocellulosefraktionen, 10 μl PCA, je 20 μl PCB, PCC bzw. PCD.

B: Fraktionen des rekonstituierten Systems: Bahn 1: 80 μl TFIIIB β (EDF), Bahn 2: 16 μl TFIIIB β (SO_3^-), Bahn 3: 80 μl Polymerase III (EDF), Bahn 4: 16 μl Polymerase III (SO_3^-), Bahn 5: 80 μl TFIIIC1 (MQ), Bahn 6: 80 μl TFIIIC1 (SO_3^-), Bahn 7: 80 μl TFIIIC2 (MQ), Bahn 8: 80 μl TFIIIC2 (SO_3^-), Bahn 9: 80 μl TFIIIC0 (MQ), Bahn 10: 80 μl TBA (SO_3^-), Bahn 11: 80 μl TFIIIC1_{like} (SO_3^-).

C: Vergleich verschiedener Transkriptionssysteme: Die Stöchiometrie und die absoluten Mengen entsprechen jeweils einer Transkriptionsprobe: Bahn 1; 5 μl S100, Bahn 2: PC-Mix, 5 μl PCB, 15 μl PCC und 7,5 μl TFIIIA (PCAD), Bahn 3: rekonstituiertes System: 2,5 μl TFIIIB β (SO_3^-), 2,5 μl Pol III (SO_3^-), 15 μl TFIIIC1 (MQ), 5 μl TFIIIC2 (MQ) und 7,5 μl TFIIIA (PCAD).

Daher wurden humane Pol III Transkriptionsfaktoren aus HEK Zellen gereinigt und die daraus resultierenden Proteinfractionen Western Blot-Analysen unterzogen. In Abb. 4A ist der La-Gehalt eines S100 (Bahn 1) und der nachfolgenden Phosphocellulosefraktionen PCA, PCB, PCC und PCD (Bahnen 2-5) getestet worden. Interessanterweise enthielten alle PC-Fractionen signifikante Mengen an La (Bahn 2-5). Neben dem vollständig erhaltenen La war insbesondere in der PCC auch ein ca. 40 kDa großes Abbauprodukt enthalten, das auf eine Verkürzung am C-Terminus zurückzuführen ist (pers. Mitteilung, Michael Bachmann).

Das offensichtlich sehr uneinheitliche chromatographische Verhalten von La führte auch bei den weiteren Reinigungsschritten der einzelnen Transkriptionsfaktoren dazu, dass fast alle Fraktionen mehr oder weniger La enthielten. Abb. 4B zeigt den La-Gehalt aller Faktoren, die an „klassischen“ Pol III Genen aktiv sind, in üblicherweise verwendeten Reinigungsstufen. Nach der zweiten Reinigungsstufe (EDF bzw. MQ, siehe 2.6.6.2.), enthalten die TFIIIB β -, Polymerase-, TFIIIC1- und TFIIIC2-Fractionen signifikante La-Mengen (Bahnen 1, 3, 5 und 7). Auch durch weitere Reinigung über einen EMD SO_3^- -Tauscher (2.6.6.3. und 2.6.6.4.) wird diese Komponente nur im Falle der TFIIIB β -Fraktion annähernd vollständig abgetrennt (Bahn 2), während im Falle der TFIIIC2-Fraktion sogar eine Anreicherung von La erfolgt (Bahn 8). Dies war nicht auf eine mangelhafte Trennungsleistung der Chromatographiematerialien zurückzuführen, da die Transkriptionsfaktoren gut voneinander getrennt wurden und typische Elutionsverhalten zeigten (Daten nicht gezeigt). Vielmehr ist es auch in anderen Arbeitsgruppen bekannt, dass die verschiedenen Zustandsformen des Proteins ein sehr stark variierendes chromatographisches Verhalten zeigen (pers. Mitteilung: Michael Bachmann).

Auffällig ist insbesondere die hohe La-Konzentration in der TFIIIC0-Fraktion (Bahn 9), die eine Sammelfraktion für die Aktivitäten TFIIIC1_{like}, TFIIIU und TBA darstellt (Oettel et al., 1998). TBA und TFIIIC1_{like} lassen sich durch Chromatographie über SO_3^- oder Resource S voneinander abtrennen (2.6.6.4.). Da TBA als terminationsbindende Komponente möglicherweise mit der Termination funktionell verknüpft ist, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Susanne Oettel überprüft, ob TBA mit dem in dieser Fraktion vorkommenden La identisch ist oder assoziiert vorliegt. Je nach Verwendung des Kationentauschers koeluierte La mit TBA (Resource S) bzw. mit TFIIIC1_{like} (SO_3^-), so dass eine solche Verbindung auszuschließen war (Daten nicht gezeigt, siehe: Oettel, 1998). Da in dem vorliegenden Fall eine SO_3^- Säule verwendet wurde, findet sich das La der TFIIIC0-Fraktion weitestgehend in der TFIIIC1_{like} Fraktion wieder (Bahn 11).

Interessant ist ferner, dass auch TFIIIA-Fraktionen La enthalten (Bahn 12), obwohl durch die Rechromatographie über Phosphocellulose eine sehr effiziente Reinigung dieses Transkriptionsfaktors erreicht wird (Seifart et al., 1989, siehe 2.6.6.1.).

Die weitreichende Verteilung von La über die Transkriptionsfaktor-haltigen Fraktionen ließ die Hypothese zu, dass in bisherigen Untersuchungen über die Pol III Transkription mit teilgereinigten oder gereinigten Transkriptionsfaktoren einige verwendete Fraktionen den hypothetischen Transkriptionsfaktor La in ausreichender Menge supplementierten und somit eine effiziente Transkription erreicht wurde, ohne dass exogenes La zugegeben werden musste.

Obwohl es also nicht möglich war, durch klassische Chromatographie über 2 bzw. 3 Säulen ein La-freies Transkriptionssystem zu erstellen, konnte doch eine signifikante Verringerung der La-Konzentration erreicht werden. Um dies zu demonstrieren, wurde in Abb. 4C jeweils ein typischer Transkriptionsansatz verschiedener Reinigungsstufen auf La getestet. Die Verwendung von PCB, PCC sowie einer PCAD Fraktion zeigten eine ähnlich hohe La-Konzentration wie bei einem Einsatz von S100 (vgl. Bahn 1 und 2). Wurden hingegen gereinigte Fraktionen verwendet (Bahn 3), betrug die La-Konzentration des Transkriptionsansatzes weniger als 5% im Vergleich zu dem Ansatz mit S100. Die tatsächliche La-Menge eines solchen Transkriptionsansatzes wurde anhand eines Western Blots ermittelt, wobei eine Titration von rekombinantem La als Standard diente. Sie betrug demnach ca. 10 ng pro Probe (Daten nicht gezeigt).

Um ein La-freies Transkriptionssystem zu etablieren, wurde versucht, den Gehalt an La im rekonstituierten Transkriptionssystem weiter abzusenken. Alle basalen Transkriptionsfaktoren, die für eine VAI-Transkription benötigt werden, sind ebenso wie die Polymerase Multiproteinkomplexe von mehreren hundert kDa. Somit lag der Versuch nahe, das 50 kDa Protein La durch Größenselektionierung von den basalen Komponenten des Polymerase III Transkriptionssystems abzutrennen. Daher wurden Gelfiltrationen (siehe 2.6.5.3.) der PCB und der PCC durchgeführt (Abb.5).

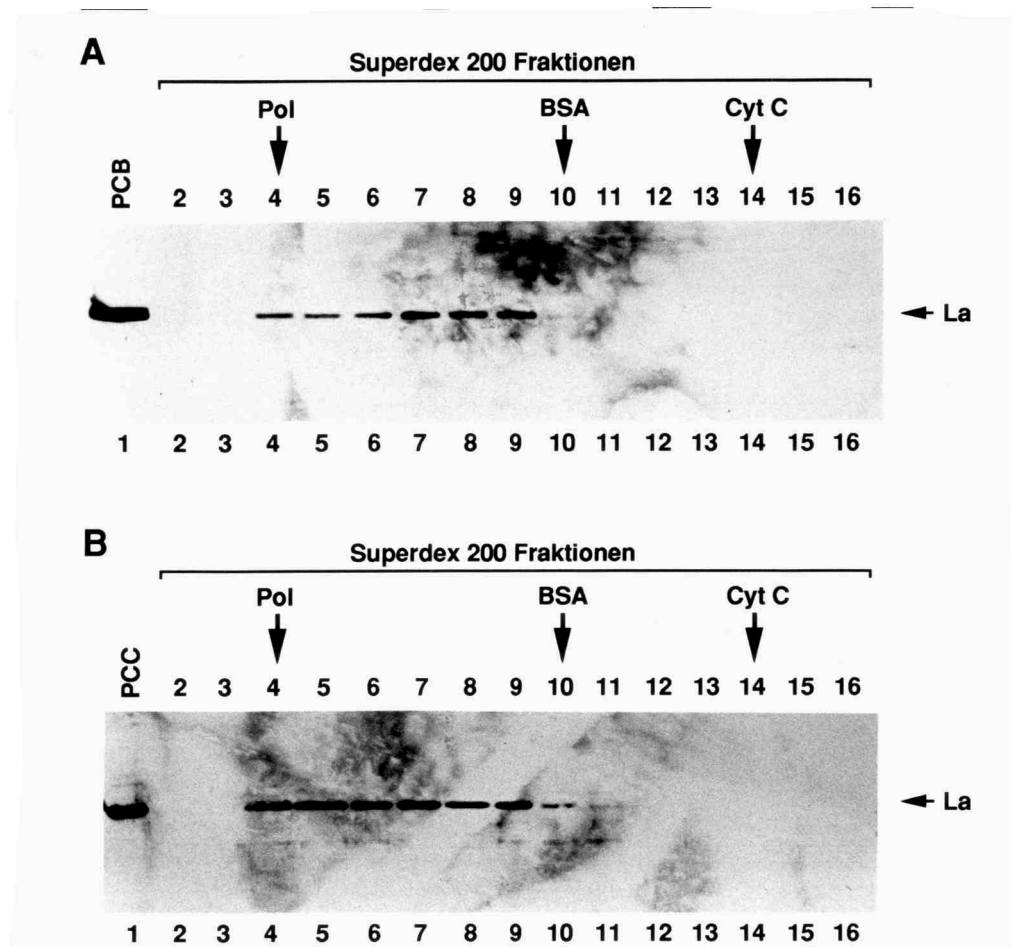


Abb. 5: Western Blot-Analyse von Superdex 200-Fractionen aus PCB und PCC

200 µl einer PCB- bzw. einer PCC-Fraktion wurde auf eine Superdex 200-Säule aufgetragen. Die Fraktionen und der jeweilige Auftrag wurden auf 12,5%ige SDS-Gele aufgetragen. Nach dem Lauf wurden die Gele geblottet und mit monoklonalen Antikörpern gegen La (SW5) inkubiert. Der Nachweis erfolgte mittels ECI (2.6.13.2.). Die Größe der zu erwartenden Proteine in den einzelnen Fraktionen wurde mittels eines Eichlaufes mit drei Proteinstandards ermittelt. Das Ausschlussvolumen der Säule entsprach Fraktion 4, (ermittelt durch Dextranblau). Die Größen der Standards sind : RNA-Polymerase (Pol): 750 kDa, Rinderserumalbumin (BSA): 67 kDa, Cytochrom C (Cyt C): 25 kDa.

A: Gelfiltration aus 200 µl PCB. Bahn 1: 12,5 µl PCB, Bahnen 2 bis 16: je 64 µl der Fraktionen 2 bis 16.

B: Gelfiltration aus 200 µl PCC. Bahn 1: 16 ml PCC, Bahnen 2 bis 16: je 80 µl der Fraktionen 2 bis 16.

Mittels eines „Polymerase-Tests“ (2.7.4.) wurde die Aktivität der RNA Polymerase in den Läufen lokalisiert. Diese befand sich in der Fraktion 4, also im Ausschlussvolumen der Säule (Daten nicht gezeigt). La wurde im Western Blot in beiden Läufen im Bereich der Fraktionen 4 bis 9 (Bahnen 4 bis 9) detektiert, wobei in beiden Fällen kein klares Maximum zu erkennen war. Erstaunlicherweise waren in den Fraktionen, die kleinere Proteine als BSA (67 kDa) enthielten (Fraktion 11 und folgende) kein La nachzuweisen. Dies lässt darauf schließen, dass das La der Fraktionen PCB und PCC vollständig in größeren Komplexen vorliegt. Dies machte eine Trennung von Transkriptionsfaktoren und La durch Größenseparation unmöglich.

3.1.4. Ein rekonstituiertes Transkriptionssystem, das mit Antikörpern gegen La depletiert wird, ist transkriptionsaktiv

Da wir von Dr. Michael Bachmann monoklonale Antikörper gegen La und auch die dazugehörigen Hybridomazellen (siehe 2.4.2.) zur Verfügung gestellt bekommen hatten, wurde auf dem Wege der Immunodepletion versucht, ein völlig La-freies Transkriptionssystem zu erstellen. Dazu wurde ein Gemisch aus den Transkriptionsfaktoren IIIA, IIIB β , IIIC1, IIIC2 sowie der Polymerase erstellt, das der optimalen Stöchiometrie für eine 5S- und auch für eine VAI-Transkription entsprach. TFIIIA wird zwar für VAI nicht benötigt, übt aber auch keinen negativen Einfluss auf die Transkription dieses Gens aus. Die verwendeten Fraktionen entsprechen exakt der Zusammensetzung, die in Abb. 4C, Bahn 3 auf La getestet wurden.

Das Gemisch wurde in drei Portionen geteilt, wobei ein Teil unbehandelt als „Auftragsfraktion“ zurückbehalten wurde. Die anderen beiden Teile (je 7 ml) wurden mit Hilfe einer Biorad Biologic Anlage über 1 ml HiTrap™ ProteinA Säulen gegeben, an denen entweder monoklonale Antikörper (SW5) oder gereinigte unspezifische Antikörper (IgGs) aus Kaninchenserum irreversibel immobilisiert waren (siehe 2.6.10). Beide Säulen waren vor der Chromatographie mit BSA geblockt worden, um unspezifische Bindungen der Proteine an das Trägermaterial zu minimieren. Jeweils der zentrale Teil der Durchbrüche wurde fraktioniert aufgefangen. Nachfolgend wurden die Auftragsfraktion sowie die beiden Durchbrüche auf ihren Proteingehalt (Bradford, 2.6.2.) sowie auf den La-Gehalt und

die Transkriptionsaktivität untersucht. Das Gemisch hat durch die Chromatographien praktisch keine Verdünnung erfahren, da die Proteinkonzentration der Durchbruchfraktionen im Vergleich zum Auftrag kaum vermindert war (Daten nicht gezeigt).

Die Abb. 6A zeigt, dass die La-Konzentration durch die Scheindepletion mit den immobilisierten IgGs nicht verringert wurde (vergleiche Bahnen 1 und 3). Hingegen war im Durchbruch der SW5 Säule (Bahn 2) kein La mehr nachzuweisen. Die Titration der Auftragsfraktion in den Bahnen 4 bis 8 zeigt, dass die erzielte Depletionseffizienz größer als 97,5% war. Da die La-Konzentration des Auftrags ca. 10 ng La pro Probe (40 µl) betrug (siehe 3.1.3.), enthielt eine Transkriptionsprobe des depletierten Gemisches demnach höchstens 0,25 ng La.

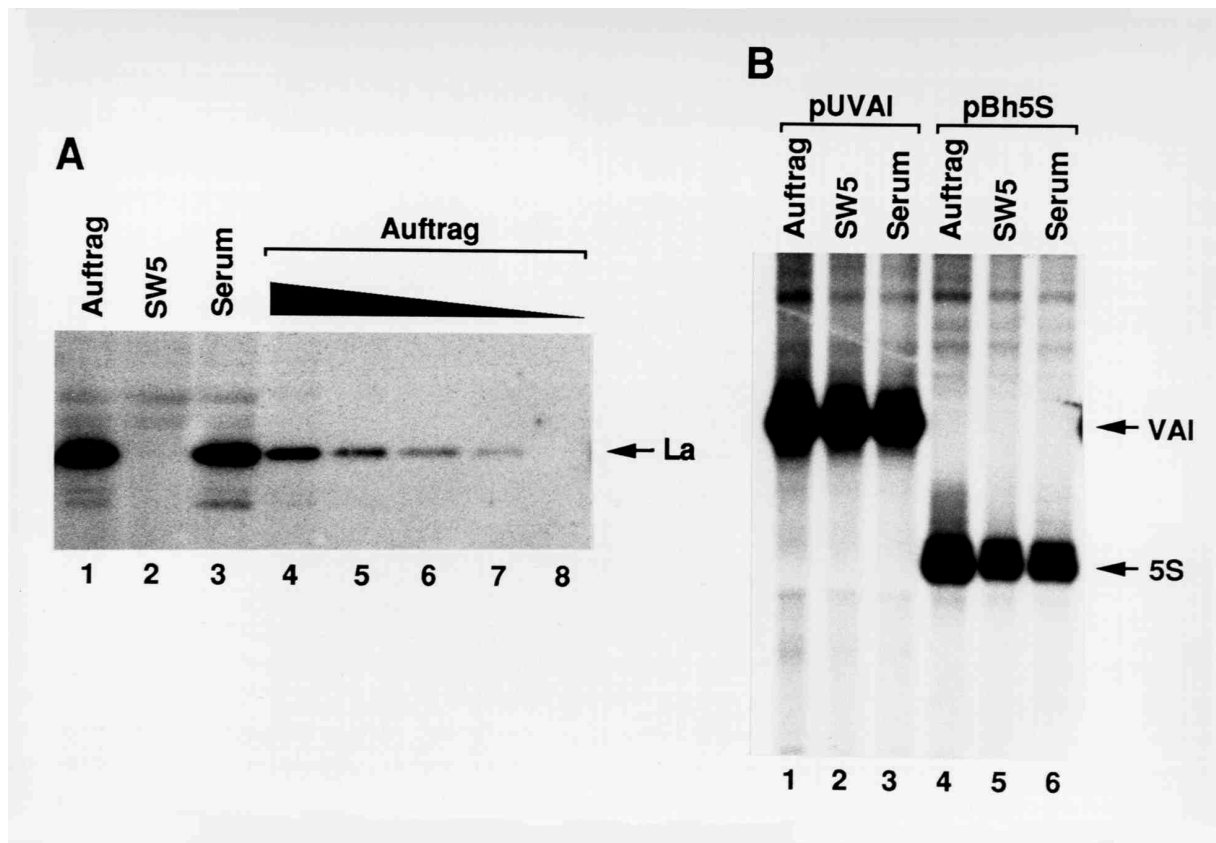


Abb. 6: Depletion eines rekonstituierten Transkriptionssystems gegen La.

Gereinigte Transkriptionsfaktoren wurden in folgender Stöchiometrie vereinigt und einer Immunodepletion unterzogen: 2,5 µl TFIIB β (SO_3^-), 2,5 µl Pol III (SO_3^-), 15 µl TFIIC1 (MQ), 5 µl TFIIC2 (MQ) und 7,5 µl TFIIA (PCAD). Außerdem wurden 7,5 µl Transkriptionspuffer dazugegeben, um ein Endvolumen von 40 µl/Probe zu erreichen. Das Gemisch wurde auf HiTrap ProteinA Säulen gegeben, die entweder mit monoklonalen Antikörpern gegen La (SW5) oder mit den gereinigten IgGs aus Kaninchenserum gekoppelt waren.

A: Western Blot. Vergleich des La-Gehaltes in den Fraktionen der Immunodepletion: Bahn 1: 80 µl Auftragsfraktion, Bahn 2: 80 µl Durchbruch der SW5-Säule, Bahn 3: 80 µl Durchbruch der

Serumantikörpersäule, Bahnen 4 bis 8: Titration der Auftragsfraktion: 16 µl (= 20% von Bahn 1), 8 µl (10%), 4 µl (5%), 2 µl (2,5%) und 0,8 µl (1%).

B: Transkription. Die Auftrags- und Durchbruchfraktionen wurden auf ihre Transkriptionsaktivität miteinander verglichen. Bahnen 1 bis 3: Transkription an pUVAI, Bahnen 4 bis 6: Transkription an pBh5S wt. Bahnen 1 und 4: 40 µl der gemeinsamen Auftragsfraktion, Bahnen 2 und 5: 40 µl der Durchbruchfraktion der SW5-Säule, Bahnen 3 und 6: 40 µl der Durchbruchfraktionen der Serumantikörpersäule.

Dass das Ausgangssignal vor der Depletion so deutlich stärker ausfiel als im Experiment 4C, Bahn 3, liegt zum einen daran, dass die doppelte Menge Fraktionsgemisch eingesetzt wurde, zum anderen war die Expositionsdauer der Autoradiographie ca. zehn mal länger, um noch die schwachen Signale der Titration detektieren zu können.

Obwohl fast das gesamte La aus dem Ansatz entfernt wurde, waren beide Durchbrüche sowohl an VAI wie auch an 5S identisch aktiv (Abb. 6B, Bahnen 2 und 3, bzw. 5 und 6). Die leichte Abnahme des Transkriptionssignals der Durchbruchfraktionen im Vergleich zum Auftrag (Bahnen 1 und 4) ist vermutlich auf physikalischen Stress zurückzuführen, den die Transkriptionsfaktoren während der Chromatographie erfahren haben.

3.1.5 Aus dem La-depletierten Transkriptionssystem sind keine La-VAI-RNA-Komplexe zu präzipitieren

Nach der Transkription mit Zellextrakten wird die meiste Pol III RNA mit La komplexiert vorgefunden (Francoeur und Mathews, 1982). Fraglich ist, ob diese Komplexierung und der Transkriptionsprozess funktionell gekoppelt sind oder ob die Interaktion von La mit der RNA nach erfolgter RNA Synthese und unabhängig von ihr erfolgt. Obwohl in den bisherigen Experimenten der hypothetische Transkriptionsfaktor La weitestgehend aus dem Ansatz entfernt worden ist, erfolgte weiterhin eine effiziente Pol III Transkription. Daher wurde für die schein- und die La-depletierten Gemische überprüft, ob die entstandene RNA mit La komplexiert vorliegt. Dies wurde durch Immunopräzipitationen mittels ProteinA Sepharose erreicht, an welche zuvor SW5-Antikörper immobilisiert wurden (2.6.10. und 2.6.12.). Die Bahnen 1 und 8 in Abb. 7 zeigen die Kontrolltranskriptionen mit La-depletiertem bzw. scheindepletiertem Gemisch. Erneut wird in beiden Fällen eine gleich effiziente Transkription erhalten. Weiterhin wurden Reaktionsansätze nach Beendigung der

Inkubation nicht durch Zugabe von ProteinaseK/SDS abgestoppt, sondern mit der SW5-ProteinA Sepharose oder zur Kontrolle mit ungekoppelter ProteinA-Sepharose behandelt. Nach dieser Inkubation wurden die Überstände abgenommen, die Sepharose dreimal gewaschen und nachfolgend mit ProteinaseK/SDS behandelt. Die RNA der Überstände (Bahnen 2, 5, 9 und 12), der jeweils dritten Waschschriffe (Bahnen 3, 6, 10 und 13) und die Präzipitate (Bahnen 4, 7, 11 und 14) wurden auf demselben PAA-Gel analysiert wie die Kontrolltranskriptionen.

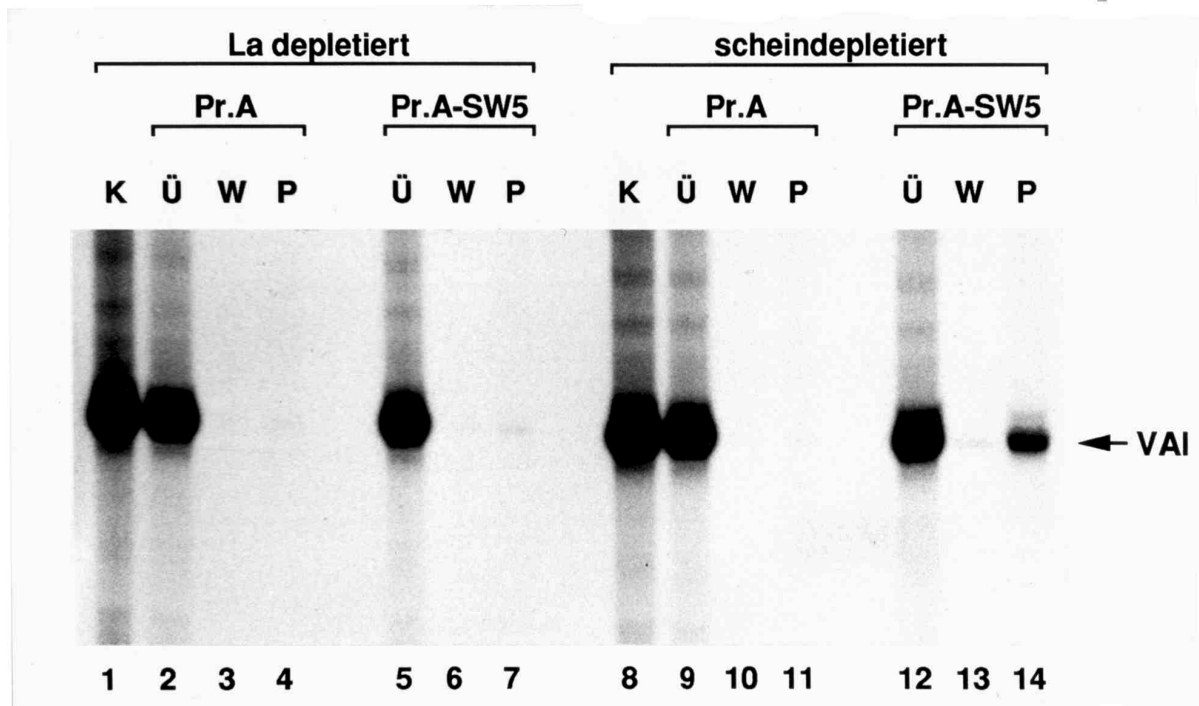


Abb. 7: Immunpräzipitation von VAI-RNA mit immobilisierten monoklonalen Antikörpern gegen La

Je 40 µl der Durchbruchfraktionen der SW5-Säule bzw. der Serumantikörpersäule wurden wie üblich transkribiert. Kontrollansätze wurden nach 90 Minuten Inkubation gestoppt. Die anderen Proben wurden einer Immunpräzipitation unterzogen (2.6.12.), die mit ProteinA Sepharose durchgeführt wurde, welche entweder mit SW5-Antikörpern gekoppelt oder ungekoppelt war. Die isolierte RNA der Kontrollansätze (K), Überstände (Ü), die dritten Waschschriffe (W) und die Präzipitate (P) wurden auf ein denaturierendes 6%iges PAA-Gel aufgetragen.

Bahnen 1 bis 7: Durchbruchfraktion von der SW5-ProteinA-Säule (La-depletiert), Bahnen 8 bis 14: Durchbruchfraktion von der Serumantikörpersäule (scheindepletiert). Bahn 1: Kontrolltranskription La-depletierte Fraktion, Bahnen 2 bis 4: Überstand, 3. Waschschritt und Präzipitat der La-depletierten Fraktion, mit ProteinA behandelt, Bahnen 5 bis 7: Überstand, 3. Waschschritt und Präzipitat der La-depletierten Fraktion, mit ProteinA-SW5 behandelt, Bahn 8: Kontrolltranskription scheindepletierte Fraktion, Bahnen 9 bis 11: Überstand, dritter Waschschritt und Präzipitat der scheindepletierten Fraktion, behandelt mit ProteinA-Sepharose, Bahnen 12 bis 14: Überstand, 3. Waschschritt und Präzipitat der scheindepletierten Fraktion, behandelt mit ProteinA-SW5-Sepharose.

Wurde der Transkriptionsansatz mit ProteinA Sepharose ohne Antikörper behandelt, war nahezu keine RNA in den Präzipitaten nachzuweisen, egal ob mit dem SW5- oder dem scheindepletierten Gemisch transkribiert wurde (Bahn 4 und 11). Das gleiche Ergebnis wurde erhalten, wenn das SW5-depletierte Gemisch mit SW5-ProteinA Sepharose behandelt wurde. Es konnten nahezu keine RNA-La Komplexe nachgewiesen werden (Bahn 7). Wurde hingegen der scheindepletierte Ansatz mit SW5-ProteinA Sepharose behandelt, konnte eine signifikante Menge RNA immunpräzipitiert werden (Bahn 14), obwohl auch in diesem Fall die größte Menge RNA nicht präzipitiert wurde und im Überstand zu finden war (Bahn 12).

3.1.6. Die Menge von präzipitierbarem VAI-RNA-Komplex ist abhängig von der La-Konzentration, während sich die Transkription durch rekombinantes La nicht stimulieren lässt

Das letzte Ergebnis zeigt deutlich, dass in dem mit SW5-Antikörper depletierten Gemisch nicht genügend La enthalten ist, um die Formation von RNA-La-Ribonucleopartikeln (RNPs) zu ermöglichen. Da auch das scheindepletierte Gemisch, verglichen mit dem S100, bereits in seiner La-Konzentration vermindert war (siehe Abb. 4C), sollte überprüft werden, ob durch Zugabe von rekombinantem La die Menge der präzipitierten RNA erhöht werden konnte. Zudem sollte abgesichert werden, dass keine Relation zwischen RNP-Assemblierung und Transkriptionseffizienz besteht.

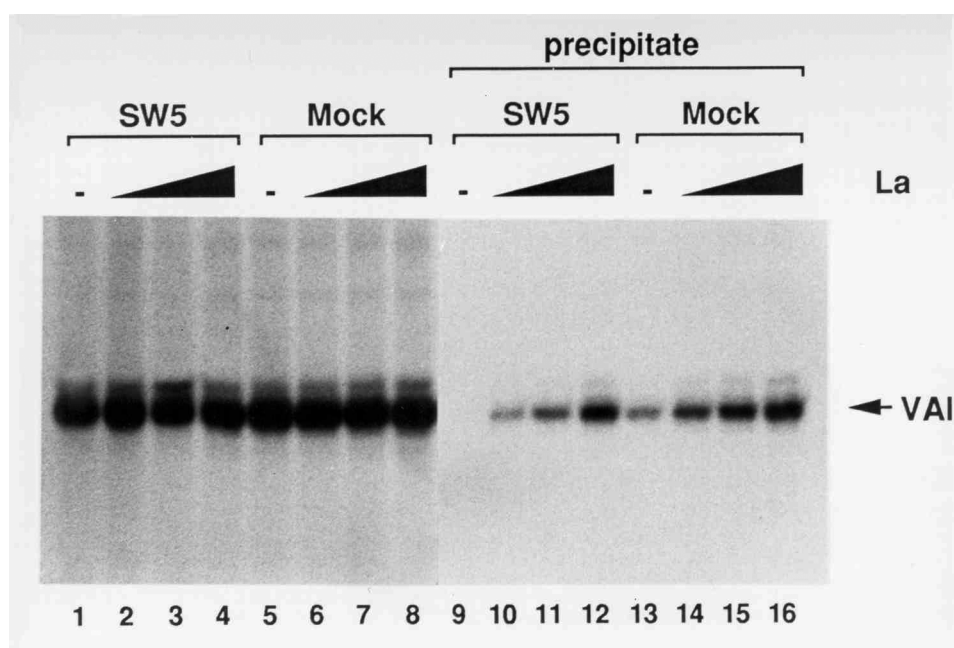


Abb. 8: VAI-Immunopräzipitation La-supplementierter Transkriptionsansätze

Je 40 µl der Durchbruchfraktionen der SW5- bzw. der Serumantikörpersäule wurden wie üblich 90 Minuten transkribiert. Rekombinantes La wurde in steigenden Mengen zum Ansatz dazugegeben. Zu allen Ansätzen wurde BSA gegeben, um mögliche Proteinkonzentrationseffekte auszuschließen. Ein Teil der Proben wurden nur transkribiert, der andere Teil danach mit ProteinA Sepharose oder ProteinA-SW5 Sepharose wie in Abb. 7 und 2.6.13. beschrieben, behandelt. Nur die Präzipitate wurden auf das Gel aufgetragen.

Bahnen 1 bis 8: Kontrolltranskriptionen, Bahnen 9 bis 16: Präzipitate der Immunopräzipitation. Bahnen 1 bis 4 und 9 bis 12: Transkription mit La-depletierter Fraktion, Bahnen 5 bis 8 und 13 bis 16: Transkription mit scheindepletierter Fraktion. Bahnen 1, 5, 9 und 13: kein rekombinantes La; Bahnen 2, 6, 10 und 14: 15 ng rekombinantes La, Bahnen 3, 7, 11 und 15: 30 ng La und Bahnen 4, 8, 12 und 16: 60 ng La.

Die Bahnen 1 bis 8 in Abb. 8 zeigen Transkriptionsansätze, zu denen jeweils steigende Mengen rekombinantes La zum SW5-depletierten (Bahnen 1-4) bzw. scheindepletierten Gemisch gegeben wurden. Entsprechend wurden Parallelansätze behandelt, die anschließend einer Präzipitation mit ProteinA-SW5 Sepharose unterzogen wurden (Bahnen 9-12: SW5-depletiert, Bahnen 13-16: scheindepletiert). Nur die Präzipitate dieser Ansätze sind gezeigt.

Die Zugabe von La sorgte für eine deutliche Zunahme der präzipitierten RNA, sowohl im scheindepletierten wie auch in SW5-depletierten Ansätzen (vergleiche Bahnen 10 bis 12 mit Bahn 9 und Bahnen 14 bis 16 mit Bahn 13). Diese Zunahme war aber nicht mit einer Stimulierung der Transkription verbunden. Die Syntheseraten in beiden Ansätzen blieben durch die La-Zugabe völlig unbeeinflusst.

Die bisherigen Experimente können ausschließen, dass La für einen effizienten und korrekten Ablauf der Transkription *in vitro* benötigt wird. Die Konzentration von La korreliert mit der Bildungsrate der La-RNA Komplexe, nicht aber mit der RNA-Synthese. Daher ist auszuschließen, dass La für die Freisetzung der RNA aus dem ternären Komplex erforderlich ist. Aufgrund der räumlichen Assoziation von Transkription und RNP-Formation im Zellkern musste aber noch geklärt werden, ob La eventuell mit dem Transkriptionskomplex assoziiert vorliegt. Um dies zu klären, war es erforderlich, eine Methode zu etablieren, um Transkriptionskomplexe zu isolieren und auf ihre Zusammensetzung hin zu überprüfen.

3.1.7. Isolierung von funktionell aktiven Transkriptionskomplexen durch Glyzeringradientenzentrifugation

Zur näheren Untersuchung assemblierter Transkriptionskomplexe ist es nötig, diese Komplexe zu reinigen. Daher wurde eine Methode, die bereits von Wingender et al. (1984) und von Jahn et al. (1987) beschrieben wurde, angewendet und modifiziert. Durch die enorme Größe der Transkriptionskomplexe (alleine der Proteinanteil ist ca. 2000 kDa groß), können sie, auf Glyzeringradienten aufgetragen, durch Ultrazentrifugation von Proteinen, die nicht Bestandteil des Komplexes sind, abgetrennt werden. Bisher wurde diese Isolierung aber nur mit Transkriptionskomplexen durchgeführt, die aus groben Zellextrakten assembliert worden waren. Es war daher interessant, zu überprüfen, ob auch Transkriptionskomplexe, die aus gereinigten Faktoren generiert werden, die nötige Stabilität besitzen, um während der Zentrifugation funktionell aktiv zu bleiben.

Daher wurde überprüft, wie sich Proteine bzw. Proteinkomplexe, die nicht an DNA gebunden sind, in einem Glyzeringradienten verhalten, und ob aus gereinigten Faktoren assemblierte funktionelle Transkriptionskomplexe von ihnen abgetrennt werden können. Als Grundsystem wurde das rekonstituierte Transkriptionssystem verwendet, das bereits in Abb. 4 vorgestellt wurde. Es wurde aber kein TFI_{IIA} hinzugegeben, da dieser Faktor für die VAI-Transkription nicht benötigt wird. Die quantitative Zusammensetzung der Transkriptionsfaktoren in diesem Gemisch wurde für ein Reaktionsvolumen von 25 µl optimiert (Daten nicht gezeigt). Die endogene Nukleotidkonzentration in diesem System war so gering, dass die Zugabe von exogenen Nukleotiden erforderlich war, um eine RNA Synthese zu ermöglichen (Daten nicht gezeigt, siehe auch Abb. 1).

Zunächst wurden während einer 25-minütigen Inkubation mit pUVAI Transkriptionskomplexe unter Zugabe von ATP, GTP und CTP assembliert, da sich diese bereits initiierten, aber durch den UTP-Mangel bedingt pausierenden Komplexe als sehr stabil erwiesen hatten (Siehe Abb. 2). In Kontrollansätzen wurde das Proteingemisch ohne DNA inkubiert, so dass sich keine Transkriptionskomplexe ausbilden konnten.

Dann wurden identische 25 µl Transkriptionsansätze vereinigt und hiervon 200 µl auf den Gradienten aufgetragen, von dem zuvor die oberen 200 µl Puffer entfernt worden waren. Nach erfolgter Zentrifugation wurden zwölf Fraktionen à 350 µl von

den Gradienten abgehoben. Diese Fraktionen wurden dann daraufhin getestet, ob sie funktionelle Transkriptionskomplexe enthielten. 50 µl jeder Fraktion wurde mit (- 32 P)GTP und dem Standard-Nukleotidgemisch versetzt, um den arretierten Komplexen eine weitere Synthese zu ermöglichen. (Die Nukleotide, die während der Vorinkubation im Reaktionsansatz vorhanden waren, liefen während der Zentrifugation aufgrund ihrer geringen Größe nicht in den Gradienten ein und standen somit der RNA-Synthese nicht mehr zur Verfügung). Anschließend wurden die Reaktionsansätze entsprechend einer *in vitro* Transkription aufgearbeitet.

Die Abb. 9A zeigt die Transkription der Fraktionen des Glyzeringradienten mit der DNA-haltigen Auftragsfraktion. Es konnte VAI-RNA-Synthese in den Fraktionen 4 bis 8 (Bahnen 5 bis 10) des Gradienten nachgewiesen werden. Zum Vergleich wurden 25 µl der Auftragsfraktion mit UTP und (- 32 P)GTP inkubiert (Bahn 1).

Um zu überprüfen, ob die detektierte Transkriptionsaktivität tatsächlich auf vorassemblierte Transkriptionskomplexe und nicht auf eine zufällige Kosedimentation der beteiligten Faktoren und der DNA in den zentralen Fraktionen des Gradienten beruht, wurde der Kontrollgradient, der ohne DNA erstellt wurde, ebenfalls auf Transkriptionsaktivität überprüft. Dazu wurde zur Auftragsfraktion und zu jeder der Glyzeringradientenfraktion pUVAI gegeben.

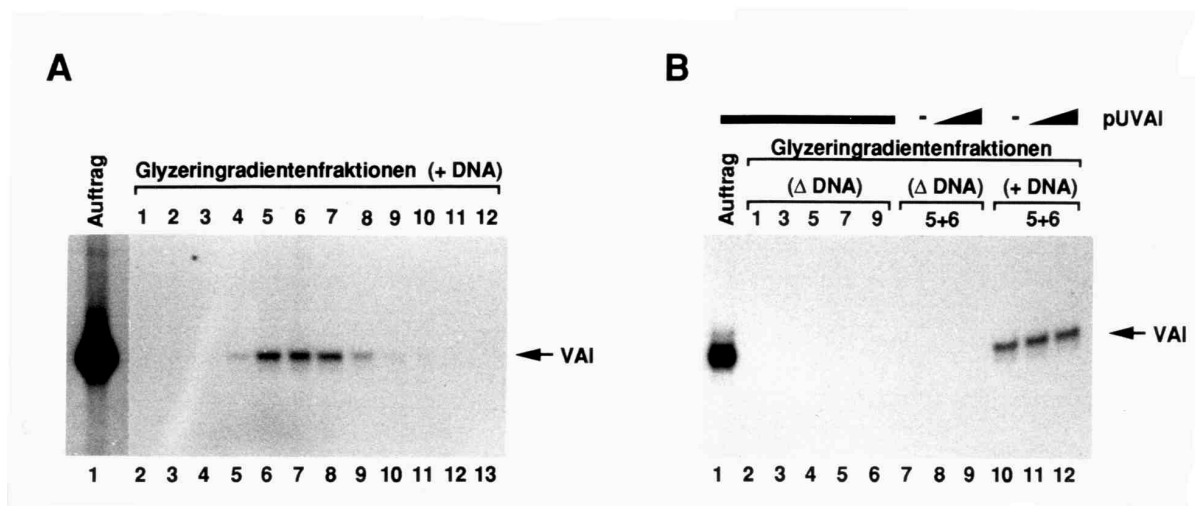


Abb. 9: *In vitro* Transkription. Identifizierung von funktionell aktiven Transkriptionskomplexen in Fraktionen aus Glyzeringradienten

Zur Assemblierung von Transkriptionskomplexen wurden 25 µl Ansätze erstellt mit 1 µl TFIIB β , 0,7 µl Polymerase, 5 µl TFIIC1 und 2,5 µl TFIIC2. Entweder wurden zusätzlich 350 ng pUVAI hinzugegeben (komplette Gradienten) oder die Fraktionen ohne DNA inkubiert (inkomplette Gradienten). Die Inkubation erfolgte in beiden Fällen für 25 Minuten bei 30°C. Um Komplexe zu bilden, die nach 6 Nukleotiden arretiert waren, wurde nur mit ATP, GTP und CTP, hingegen ohne UTP

und (^{32}P)GTP inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze vereinigt und über Glyzeringradienten isoliert (siehe 2.6.7.).

A: Test des kompletten Gradienten auf Transkriptionsaktivität. Durch Zugabe von Nukleotiden sowie (^{32}P)GTP wurden die Glyzeringradientenfractionen der kompletten Gradienten auf ihre Transkriptionsaktivität getestet. Als Kontrolle wurde die Auftragsfraktion mit UTP und (^{32}P)GTP versehen. Bahn 1: 25 μl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 50 μl der Gradientenfractionen 1 bis 12.

B: Test des inkompletten Glyzeringradienten auf Transkriptionsaktivität. Die Fractionen des inkompletten Gradienten wurden genau wie in Abb. 9A auf Transkriptionsaktivität überprüft. Da der Auftragsfraktion vor der Zentrifugation keine DNA zugegeben wurde, wurde die Auftragsfraktion sowie alle Gradientenfractionen mit 100 ng pUVAI transkribiert. Zum Vergleich wurde außerdem pUVAI an Fractionen des inkompletten wie des kompletten Gradienten titriert. Bahn 1: 25 μl Auftragsfraktion, versetzt mit 100 ng pUVAI, Bahnen 2 bis 6: je 50 μl der Gradientenfractionen 1, 3, 5, 7 und 9, versetzt mit 100 ng pUVAI. Bahnen 7 bis 9: Titration von pUVAI an einem Gemisch aus Fraction 5 und 6 des inkompletten Gradienten (je 50 μl), keine DNA, 40 ng und 200 ng pUVAI, Bahnen 10 bis 12: Titration von pUVAI an einem Gemisch aus Fraction 5 und 6 des kompletten Gradienten (je 50 μl), keine zusätzliche DNA, 40 ng und 200 ng pUVAI.

Während der Auftrag gut transkriptionsaktiv war (Abb. 9B, Bahn 1), war in keiner der Fractionen des Gradienten Transkriptionsaktivität nachzuweisen. Eine genauere Titration der DNA sowohl an den jeweiligen Fractionen 5 des inkompletten (Bahnen 7 bis 9) wie auch des kompletten Gradienten (Bahnen 10 bis 12) zeigte an ersterem ebenso keine Aktivität. Hingegen wurde die Fraction 5 des kompletten Gradienten durch die zusätzliche DNA weder positiv noch negativ beeinflusst.

Diese Daten sprechen gegen eine zufällige Kosedimentation der Faktoren und der DNA in den kompletten Gradienten im Bereich der Fractionen 5 bis 6, sondern lassen deutlich erkennen, dass es sich in diesen Fractionen in der Tat um funktionelle Transkriptionskomplexe handelt, die von den nicht integrierten Transkriptionsfaktoren abgetrennt wurden (siehe auch 3.1.9, Abb. 14).

3.1.8. TBP als Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIB ist Bestandteil des Transkriptionskomplexes, während La nicht mit dem Komplex assoziiert vorliegt

Um weiter abzusichern, dass es tatsächlich gelungen ist, funktionelle Transkriptionskomplexe zu isolieren, sollte die Verteilung von TBP (als Untereinheit von TFIIB) in diesen Gradienten nachgewiesen werden. Außerdem sollte das Sedimentationsverhalten von La untersucht werden. Es zeigte sich aber, dass die

Konzentration der Proteine in den Gradienten zu gering war, um auf direktem Wege eine Western Blot Analyse durchzuführen. Daher wurden jeweils drei Parallelgradienten erstellt und die korrespondierenden Fraktionen dieser Gradienten vereinigt.

Da es sich bei jeder Fraktion um drei mal 350 µl gleich 1,05 ml Volumen handelte, mussten die Fraktionen eingeeengt werden, um sie auf ein SDS Gel auftragen zu können. Versuche, dies durch Acetonfällung zu erreichen, scheiterten, da längst nicht alle Proteine ausfielen (Daten nicht gezeigt). Auch ein Eindampfen der Proben war aufgrund der hohen Glycerinkonzentration nicht möglich. Daher wurde versucht, die Proteine über Strataclean Resin der Firma Stratagene zu konzentrieren (siehe 2.6.14.).

Im linken Block von Abb. 10 (Bahnen 1-7) wurden 33 µg einer PCB Fraktion als Beispiel für eine komplexe Proteinfraction verwendet, mit unterschiedlichen Mengen Resin versetzt und für zwei Stunden inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und ebenso wie die Präzipitate mit SDS-Probenpuffer versetzt und auf ein SDS/PAA-Gel aufgetragen.

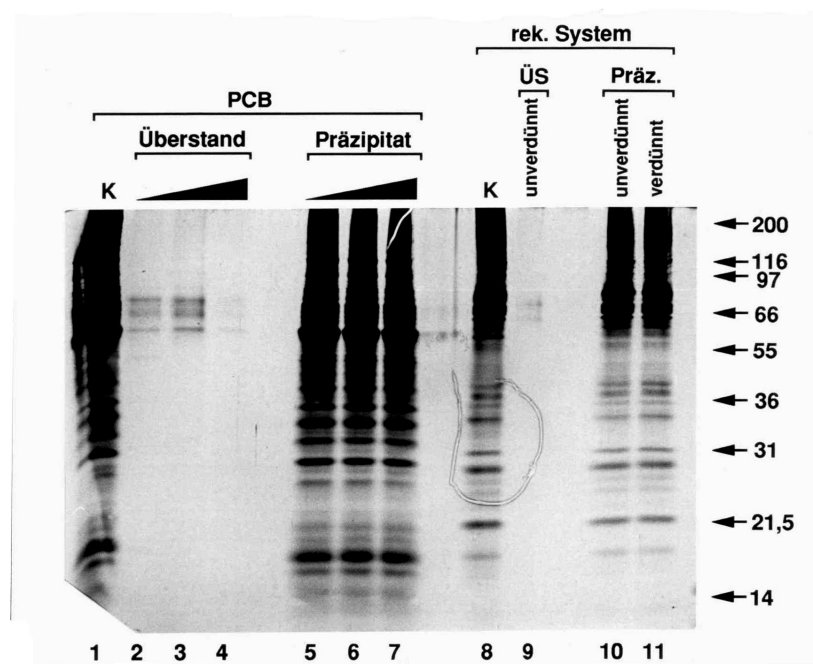


Abb. 10: SDS-Gel. Fällung von komplexen Proteinfractionen mittels Strataclean™ Resin

Eine Fraktion, die ein komplexes Proteingemisch enthält (PCB), wurde mit Strataclean Resin der Firma Stratagene präzipitiert. Überstände und Resin wurden auf ein 12,5%iges Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde ein rekonstituiertes Transkriptionssystem eingesetzt, das in seiner Zusammensetzung zwei 25 µl Transkriptionsansätzen entsprach. Dieses Gemisch wurde entweder unverdünnt (50 µl +20 µl Resin) oder auf 1,8 ml verdünnt behandelt. Das Gel wurde silbergefärbt.

Bahnen 1 bis 7: 10 µl PCB Fraktion (=33 µg), Bahn 1: PCB, unbehandelt, Bahnen 2 bis 4: Überstände der Präzipitationen mit 10, 20 und 30 µl Resin (ca. 50% w/v), Bahnen 5 bis 7: Präzipitate mit 10, 20 und 30 µl Resin. Bahnen 8 bis 11: Gemisch aus 2 µl TFIIIB β (SO₃⁻), 1,4 µl Pol III (SO₃⁻), 10 µl TFIIIC1 (MQ) und 5 µl TFIIIC2 (MQ), Bahn 8: unbehandeltes rekonstituiertes System, Bahn 9: Überstand des unverdünnten rek. System, präzipitiert mit 20 µl Resin, Bahn 10 und 11: Präzipitate des unverdünnten bzw. verdünnten rek. Systems. Der verdünnte Überstand wurde verworfen.

In der Bahn 1 wurde die unbehandelte Fraktion aufgetragen. In den Bahnen 2 bis 4 wurden die Überstände, in den Bahnen 5 bis 7 die Präzipitate aufgetragen. Der Vergleich mit der Auftragsfraktion zeigt deutlich, dass bereits mit 10 µl Resin nahezu alle Proteine gebunden werden konnten und im Präzipitat vorhanden waren, während im Überstand nur eine sehr geringe Menge Protein nachzuweisen war (vergleiche Bahnen 2 und 5 mit Bahn 1).

Im rechten Block wurde ein entsprechendes Experiment mit dem rekonstituierten System durchgeführt, das auf die Glyzeringradienten aufgetragen wurde. Als Probe diente eine Menge des Fraktionsgemisches, die zwei Transkriptionsproben entsprach. Dieses Gemisch wurde entweder direkt mit dem Resin versetzt oder zuvor auf 1,8 ml Volumen mit Transkriptionspuffer verdünnt. Eine unbehandelte Probe (Bahn 8), der unverdünnte Überstand (Bahn 9) sowie die Präzipitate beider Proben (Bahnen 10 und 11) wurden ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Erneut wurden praktisch alle Proteine gebunden, egal ob die Probe verdünnt war oder nicht. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass alle Proteine, auch die der sehr niedrig konzentrierten Glyzeringradientenfraktionen, präzipitierbar sind.

Anschließend wurden nun die vereinigten Fraktionen aus drei identischen Glyzeringradienten, welche ohne DNA erstellt worden waren, mit Strataclean Resin gefällt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde geblottet und nacheinander mit monoklonalen Antikörpern gegen TBP und La inkubiert. Die Abb. 11 zeigt die Autoradiographie des Gradienten nach der zweiten Inkubationsrunde mit La-Antikörpern. Da die Antikörper nach dem TBP-Nachweis nicht von der Membran entfernt wurden, sind beide Proteine detektierbar.

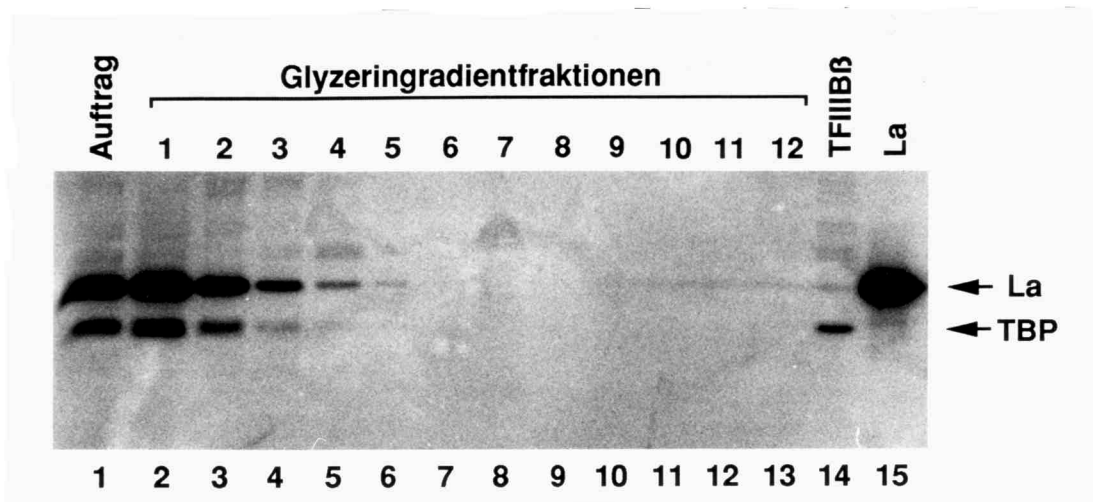


Abb.11:Western Blot. La- und TBP-Verteilung in Glyzeringradienten ohne Transkriptions-komplexassemblierung

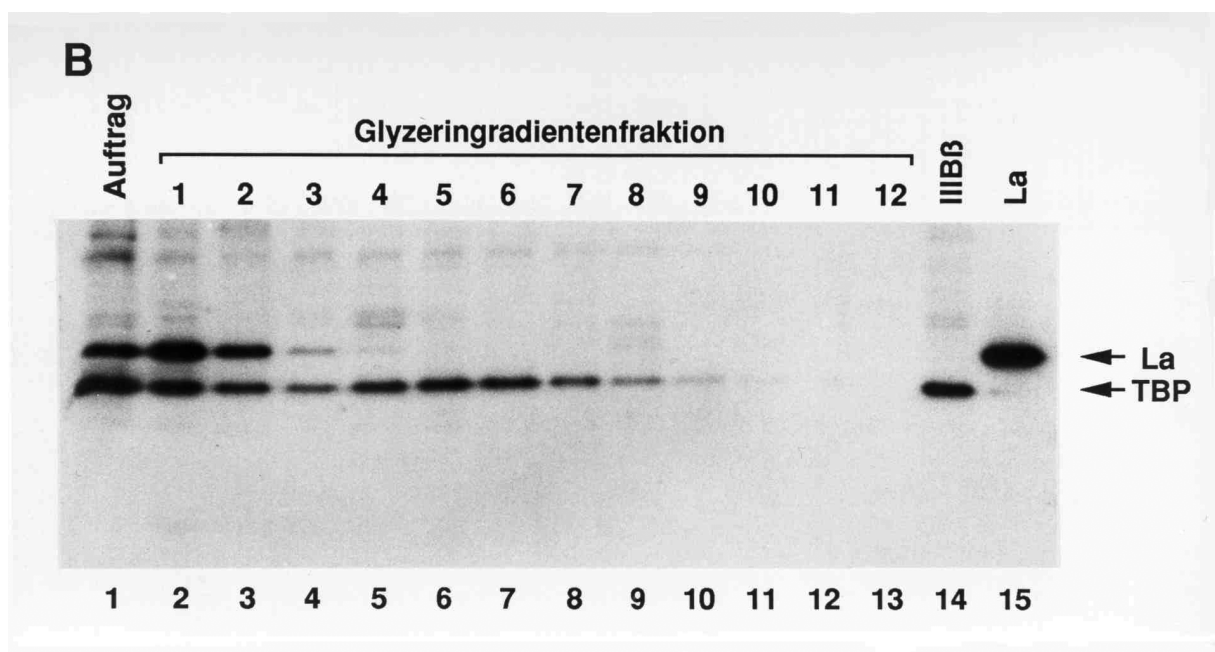
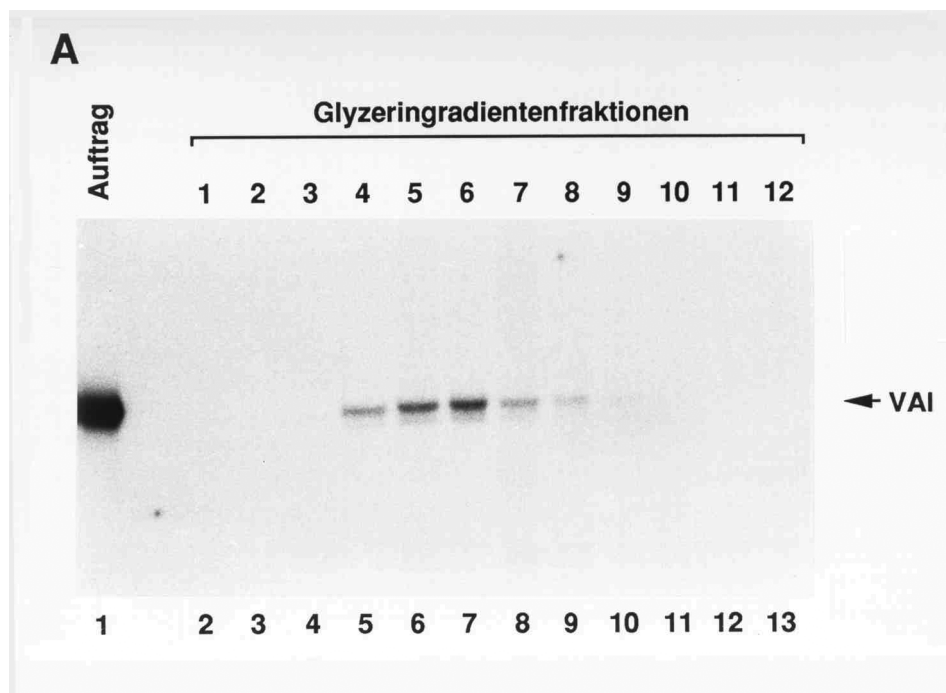
Drei identische Gradienten mit Auftragsfraktionen ohne DNA wurden wie in Abb. 9 beschrieben erstellt. Entsprechende Fraktionen der Gradienten wurden vereinigt, mit 20 µl (50% w/v) Strataclean Resin gefällt und auf ein 12,5%iges SDS Gel aufgetragen. Das Gel wurde geblottet und mit Antikörpern gegen TBP inkubiert. Nach Inkubation mit ^{125}I markiertem Zweitantikörper wurde die Membran mit dem Phosphorimager ausgewertet. Die Antikörper wurden nicht entfernt, sondern die Membran mit einem Gemisch aus SW5- und 3B9 Antikörpern gegen La und nachfolgend noch einmal mit dem Zweitantikörper inkubiert. Die Auswertung erfolgte erneut mit dem Phosphorimager und mittels Autoradiographie. Bahn 1: 170 µl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: 1050 µl der Fraktionen 1 bis 12 des Gradienten, Bahn 14: 5 µl TFIIIB β (SO_3^-), Bahn 15: 5 µl La-Fraktion, aus PCA über Q-Sepharose und Heparin-Fractogel gereinigt (2.6.6.5.).

TBP und La sind neben der Auftragsfraktion (Bahn 1) und den Positivkontrollen (Bahnen 14 bzw 15) nur in den proximalen Fraktionen des Gradienten zu detektieren. Dabei finden sich beide Proteine hauptsächlich in Fraktion 1 und zu den distalen Fraktionen hin rasch abnehmend. Weder TBP noch La sind hingegen in den Fraktionen 5 bis 7 nachzuweisen, die in den vorangegangenen Experimenten Transkriptionsaktivität in kompletten Glyzeringradienten zeigten.

Zusätzliche wurde in einem „Polymerase Test“ (2.7.4.) überprüft, in welchen Fraktionen Polymeraseaktivität nachgewiesen werden konnte. Diese beschränkte sich fast ausschließlich auf die Fraktion 2 (Daten nicht gezeigt).

Durch diese Experimente konnte klar nachgewiesen werden, dass große Proteinkomplexe, wie es der TBP-TAF-Komplex TFIIIB β , die Polymerase und vermutlich auch (siehe Abb. 5) La darstellen, nur in den proximalen Fraktionen der Glyzeringradienten zu finden sind, wenn keine DNA zu den Proben gegeben wurde.

Als nächstes sollte untersucht werden, wie sich TBP und La auf Gradienten verteilt, über die vollständige Transkriptionsansätze mit DNA zentrifugiert wurden.



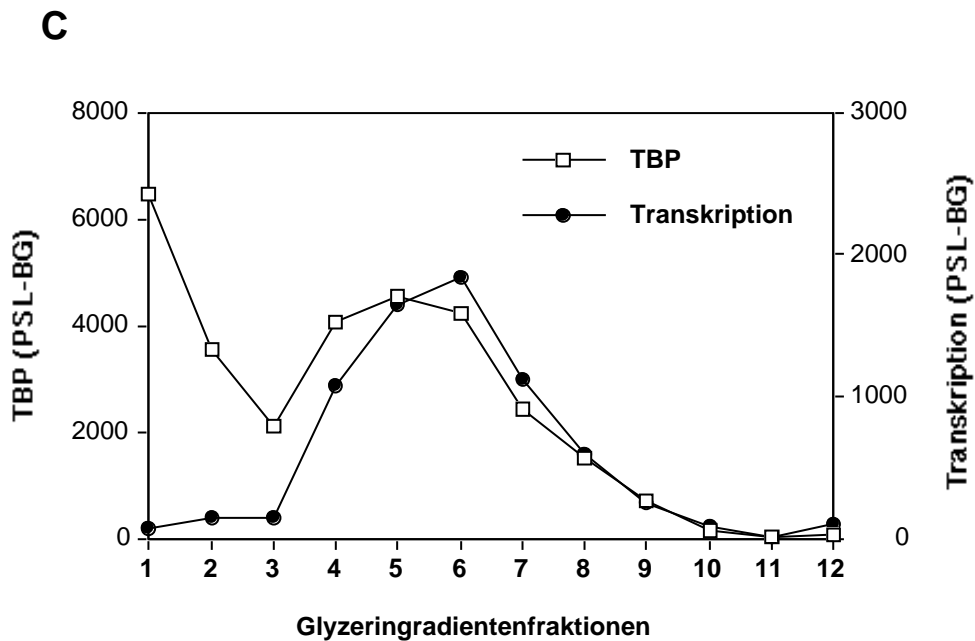


Abb. 12: Analyse funktionell aktiver Transkriptionskomplexe

Nach sechs Basen arritierte Transkriptionskomplexe wurden wie in Abb. 9 assembliert und auf sechs Glyzeringradienten aufgetragen. Entsprechende Fraktionen der Gradienten wurden anschließend vereinigt.

A: *In vitro* Transkription der Gradientenfractionen. Bahn 1: 7,2 µl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 50 µl der Gradientenfractionen 1 bis 12.

B: Western Blot. Die vereinigten Glyzeringradienten wurden wie in Abb. 11 auf die Verteilung von TBP und La untersucht. Bahn 1: 160 µl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 1850 µl der Gradientenfractionen 1 bis 12, Bahn 14: 5 µl TFIIB β (SO_3^-), Bahn 15: 5 µl La-Fraktion, aus PCA über Q-Sepharose und Heparin-Fractogel gereinigt.

C: Quantitativer Vergleich der Verteilung der Transkriptionsaktivität und der TBP-Verteilung innerhalb des Glyzeringradienten. PSL-BG ist die interne Maßeinheit des Phosphorimagers für die Signalstärke auf der „Imaging Plate“ abzüglich des Hintergrundes.

In Abb. 12A ist die Transkription der vereinigten Fraktionen gezeigt. Die Aktivität war erneut maximal in Fraktion 6 (Bahn 7). Die Verteilung von TBP und La in diesen Gradienten zeigt Abb. 12B. Deutlich zu detektieren ist, dass TBP ein bimodales Sedimentationsverhalten zeigte. Ein großer Teil des TBPs sedimentierte in den proximalen Fraktionen des Gradienten mit einem Maximum in Fraktion 1, ähnlich wie in den Gradienten ohne DNA. Zusätzlich war ein zweites Maximum in Fraktion 5 zu detektieren, das offensichtlich DNA-gebundenes TBP repräsentiert. In Abb. 12C ist die Verteilung von TBP und der Transkriptionsaktivität miteinander verglichen. Deutlich ist zu erkennen, dass die Transkription weitgehend mit dem zweiten TBP-Maximum kosedimentiert. Allerdings ist sie um eine Fraktion in den distalen Bereich

verschoben. Die Gründe für diese Verschiebung werden in 3.1.9. näher betrachtet. La hingegen zeigte ein sehr ähnliches Sedimentationsverhalten wie in den Gradienten ohne DNA. Das meiste La war in der Fraktion 1 nachzuweisen mit einer raschen Abnahme zu den distalen Fraktionen hin. Auf keinen Fall konnte eine Kosedimentation mit den Transkriptionskomplexen festgestellt werden, wie es für TBP der Fall war.

TBP als Bestandteil des essentiellen Transkriptionsfaktors TFIIB β konnte also als integraler Bestandteil der Transkriptionskomplexe nachgewiesen werden, während La nicht assoziiert mit dem Transkriptionskomplex vorlag.

3.1.9. TBP, das in den Transkriptionskomplex integriert ist, lässt sich von unspezifisch an die Vektor-DNA gebundenem TBP trennen

Aus der Gegenüberstellung von Transkription und Western Blot ist ersichtlich, dass ein kleiner Unterschied zwischen dem TBP-Maximum und dem Transkriptionsmaximum besteht (Abb. 12C). Während TBP maximal in Fraktion 5 sedimentierte, war die Transkriptionsaktivität in Fraktion 6 am größten. Ob dies nur auf ein bloßes Verschleppen des TBPs aus den proximalen Fraktionen während der Gradientenfractionierung zurückzuführen war, oder ob es noch einen anderen Grund für diesen Unterschied gab, wurde weiter untersucht. Es sollte dabei überprüft werden, ob TBP, vermutlich als Bestandteil von TFIIB β , außerhalb des spezifischen Transkriptionskomplexes an die Plasmid-DNA binden kann, da bekannt ist, dass pUC kryptische Promotoren enthält, die auch unspezifische Pol III Transkriptionen initiieren können (Heike Rothfels, 1998).

Erneut wurden sechs Glyzeringradienten erstellt, wobei auf drei von ihnen ein komplettes Transkriptionsgemisch aufgetragen wurde, auf die anderen drei hingegen nur pUVAI, TFIIB β und Polymerase III. Zusätzlich wurde ein Gradient erstellt, auf den nur DNA, aber keine Proteine geladen wurden (siehe unten). Die entsprechenden Gradientenfractionen wurden wie üblich vereinigt und in der Transkription getestet. Die inkompletten Gradienten (ohne TFIIC1/IIIC2) zeigten keine Transkriptionsaktivität, während die kompletten Gradienten erneut ihr Transkriptionsmaximum in Fraktion 6 zeigten (Daten nicht gezeigt). Dann wurden die Fraktionen einer Western Blot-Analyse unterzogen.

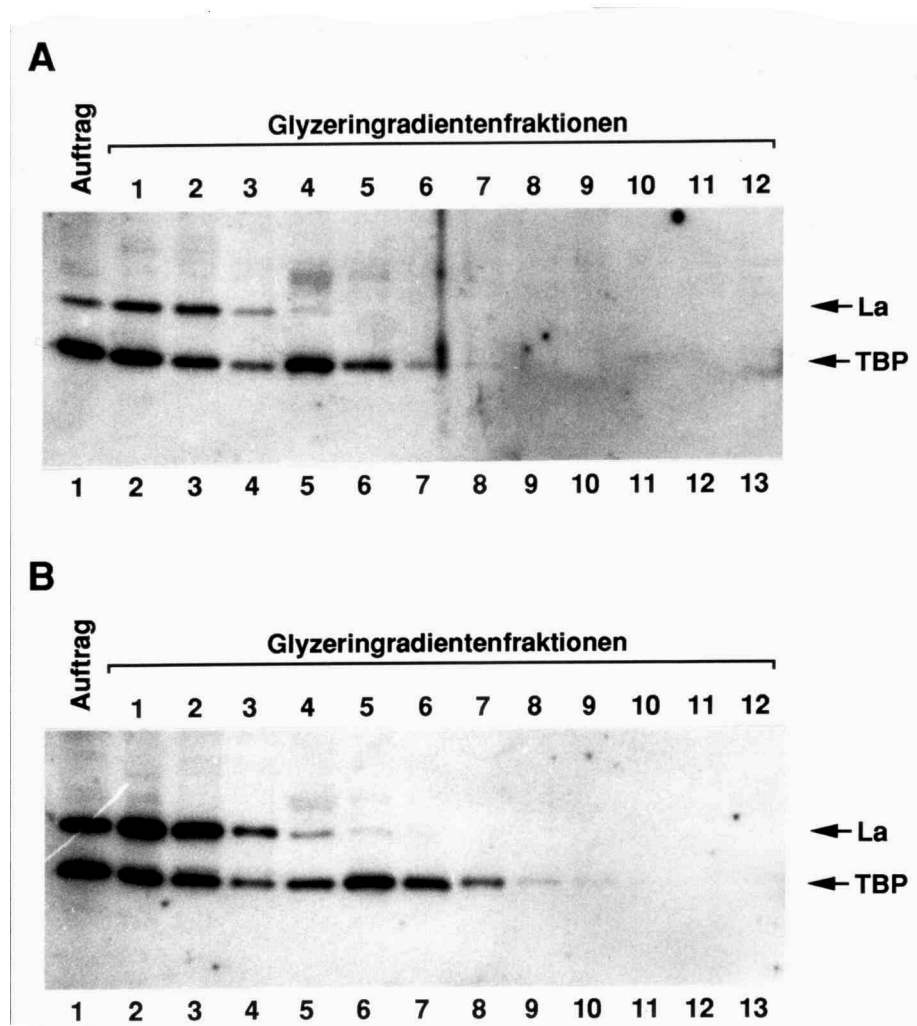


Abb. 13: Western Blot. Vergleich der TBP- (und La-) Verteilung in kompletten Gradienten und in Gradienten, die ohne TFIIC1 und TFIIC2 erstellt wurden.

Drei Glyzeringradienten wurden wie in Abb. 12 erstellt, drei weitere wurden ohne Zugabe von TFIIC1 und TFIIC2 erstellt. Gleiche Fraktionen der identischen Gradienten wurden vereinigt, auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen und wie üblich geblottet und mit Antikörpern inkubiert.

A: inkomplette Gradienten ohne TFIIC1/IIC2. Bahn 1: 135 µl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 950 µl der Gradientenfraktionen 1 bis 12.

B: komplette Gradienten. Bahn 1: 135 µl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 950 µl der Gradientenfraktionen 1 bis 12.

Die Abb. 13A zeigt den inkompletten Gradienten. Überraschenderweise zeigte TBP auch in diesem Gradienten eine bimodale Verteilung. Neben dem nicht-inkorporiertem TBP in den proximalen Fraktionen des Gradienten wurde ein weiteres Maximum in Fraktion 4 (Bahn 5) detektiert. Im Vergleich dazu zeigte der komplette Gradient (Abb. 13B) erneut ein klares Maximum des TBP in der Fraktion 5 (Bahn 6), nahezu identisch mit der Verteilung in Abb. 12B. Zudem war das TBP im Vergleich zu Abb. 13A deutlich zu den distalen Fraktionen verschoben. Während in den

inkompletten Gradienten TBP bis max. Fr. 7 zu detektieren war, war dies in den kompletten Gradienten bis Fraktion 9 möglich.

Somit ist ersichtlich, dass TFIIB β /TBP auch außerhalb von Transkriptionskomplexen mit der DNA interagieren kann. Es ist daher anzunehmen, dass in Gradienten, die mit kompletten Auftragsfraktionen erstellt worden sind, drei Zustandsformen von TBP-Molekülen vorliegen: nicht mit der DNA komplexiertes TBP (Maximum in Fraktion 1), unspezifisch an die Plasmid-DNA gebundenes TBP (Maximum in Fraktion 4) und spezifisch in die VAI-Transkriptionskomplexe integriertes TBP (Maximum in Fraktion 6). Dass das TBP-Maximum in den kompletten Gradienten in Fraktion 5 zu detektieren ist, ist vermutlich auf eine Überschneidung des Sedimentationsverhaltens letzterer beider TBP-Zustandsformen zurückzuführen.

Um diesen Befund zu untermauern, wurde die Verteilung des Plasmids im Gradienten genauer untersucht. 30 μ l jeder Fraktion der verschiedenen Gradienten wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Durch Ethidiumbromidfärbung konnte die Verteilung der DNA analysiert werden. In Abb. 15A ist die DNA-Verteilung in Gradienten ohne Proteinfractionen zu sehen. pUVAI sedimentierte mit einem Maximum in Fraktion 4 (Bahn 5). In dem Gradient, der ohne TFIIC1 und TFIIC2, aber mit Polymerase und TFIIB β erstellt wurde (15B), verschob sich das Sedimentationsverhalten nur unwesentlich. Immer noch befand sich das Maximum der DNA in Fraktion 4. In dem Gradienten, der vollständige Transkriptionskomplexe enthielt, war das Sedimentationsverhalten der DNA klar in die distalen Fraktionen verschoben mit einem klaren Maximum in Fraktion 5 (Bahn 6). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die sehr große Plasmid-DNA alleine signifikant weiter in den Gradienten einläuft, als dies für große Proteinkomplexe wie zum Beispiel die RNA-Polymerase III oder TFIIB β der Fall ist. Die unwesentliche Vergrößerung des Molekulargewichts aufgrund unspezifisch gebundener Proteine wie TFIIB β bzw. TBP kann das Sedimentationsverhalten des Plasmids nicht signifikant ändern. Diese Assoziate finden sich ebenso in Fraktion 4. Plasmide, an denen Transkriptionskomplexe assembliert sind, haben hingegen eine solche Molekülmasse, dass eine klare Verschiebung der Sedimentation in die distalen Fraktionen erfolgt.

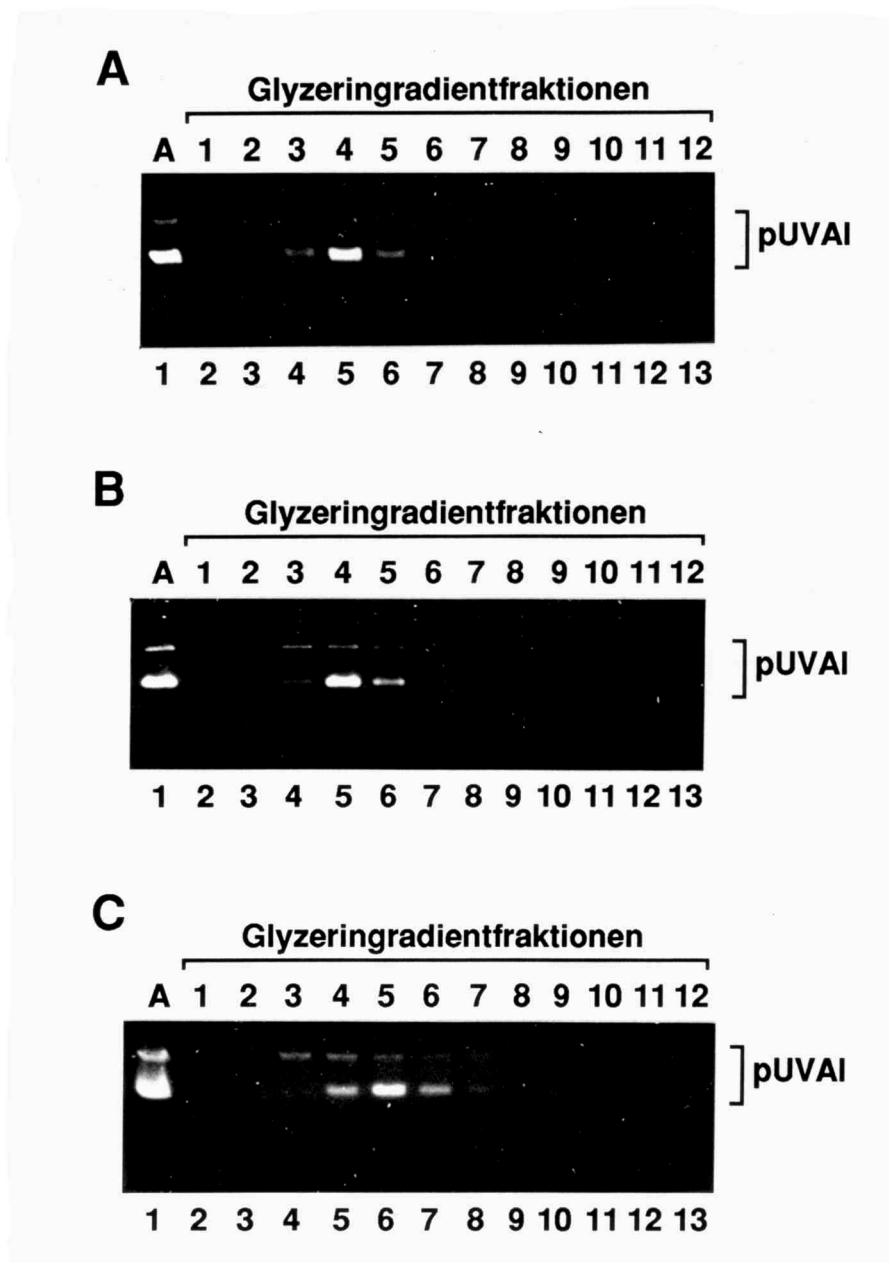


Abb. 14: Agarosegel. Verteilung der Plasmid-DNA über die Glyzeringradienten.

Jeweils 30 µl der Glyzeringradientenfraktionen aus den verschiedenen Gradienten wurden auf ein 1%iges Ethidiumbromid-haltiges Agarosegel aufgetragen. (2.3.1.).

A: Verteilung von pUVAI auf einem Glyzeringradienten, der nur mit pUVAI, aber ohne Proteine beladen wurde. Bahn 1: 20 µl Auftragsfraktion, Bahnen 1 bis 13: je 30 µl der Fraktionen 1 bis 12.

B: Verteilung von pUVAI in den Gradienten, die mit DNA, TFIIB β und Polymerase, aber ohne TFIIC1 und TFIIC2 erstellt wurden. Bahn 1: 20 µl Auftragsfraktion, Bahnen 1 bis 13: je 30 µl der Fraktionen 1 bis 12.

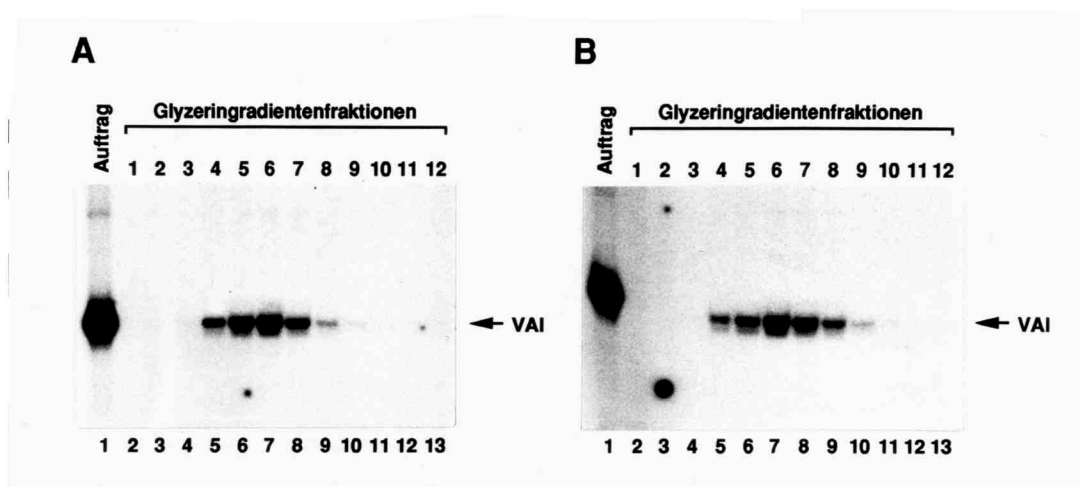
C: Verteilung von pUVAI in den kompletten Gradienten. Bahn 1: 20 µl Auftragsfraktion, Bahnen 1 bis 13: je 30 µl der Fraktionen 1 bis 12.

3.1.10. La ist zu keiner Phase des Transkriptionszyklus mit dem Transkriptionskomplex assoziiert, während TBP stabil komplexiert bleibt

Die oben beschriebenen Daten zeigen, dass VAI-Transkriptionskomplexe, die nach sechs Nukleotiden arretiert worden sind, nicht mit La assoziiert vorliegen. Nach dem Modell von Maraia soll La aber sowohl bei der Rekrutierung der Polymerase wie auch bei der Auflösung des ternären Komplexes am Terminator benötigt werden und Interaktionen mit der Polymerase aufnehmen. Ferner soll La die RNA bereits binden, bevor die UUU-OH Erkennungssequenz synthetisiert ist (Fan et al., 1998).

Das bisher etablierte Versuchssystem erlaubte es, diese Hypothesen zu überprüfen. Daher wurden analog zu den oben vorgestellten arretierten Transkriptionskomplexen solche Transkriptionskomplexe isoliert, die ohne Nukleotide assembliert wurden und dadurch nicht initiiert waren. Ferner wurden Komplexe unter Vorhandensein aller vier Nukleotide assembliert, die somit bereits während der Vorinkubation zyklisch transkribierten. Im letzteren Fall wurden also Transkriptionskomplexe auf den Glyzeringradienten aufgetragen, die sich zu diesem Zeitpunkt in unterschiedlichen Phasen des Transkriptionszyklus befanden.

Jeweils drei Gradienten wurden, wie oben beschrieben, erstellt, und die einzelnen Fraktionen auf ihre Aktivität untersucht. Abb. 15A zeigt die Transkription der Glyzeringradienten mit den Komplexen, die ohne Nukleotide assembliert wurden, Abb. 15B die Transkription der Komplexe, welche mit allen Nukleotiden assembliert wurden.



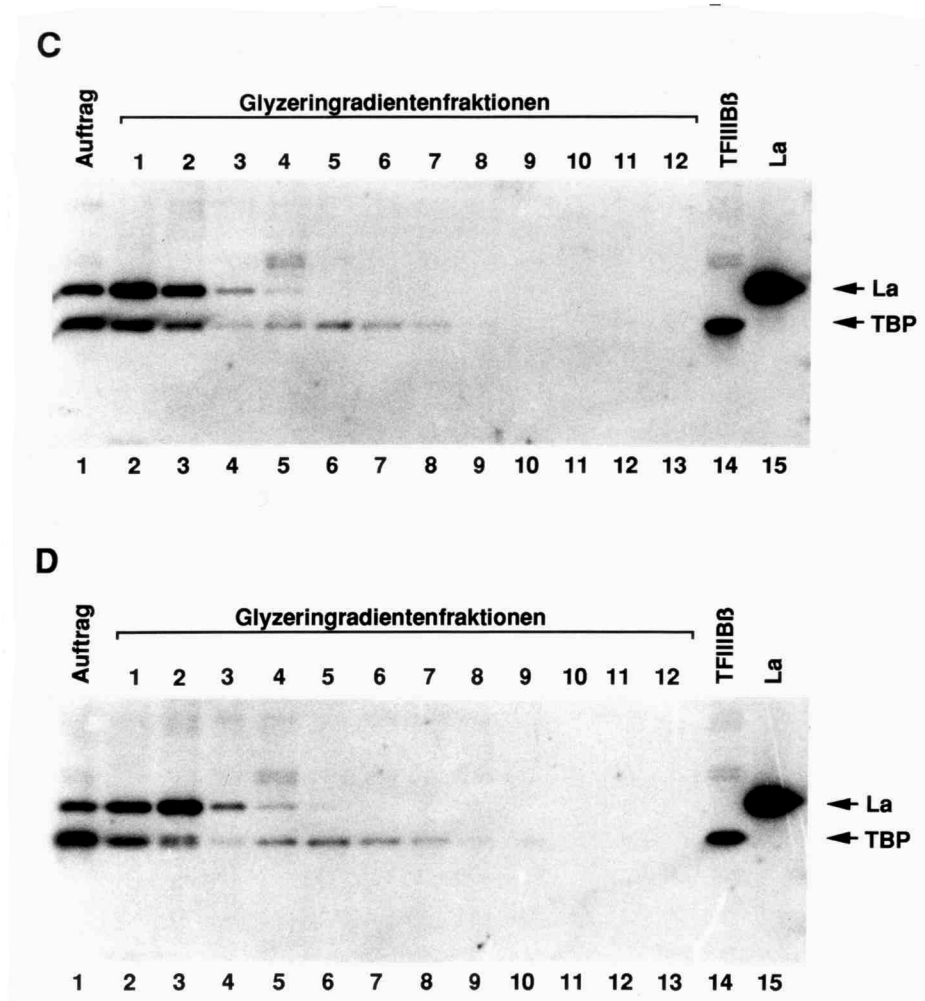


Abb. 15: Verteilung von TBP und La in Glyzeringradienten mit assemblierten, aber nicht initiierten sowie in Gradienten mit zyklisch transkribierenden Transkriptionskomplexen

Jeweils drei Glyzeringradienten wurden erstellt, auf die entweder assemblierte, aber nicht initiierte Transkriptionskomplexe (Vorinkubation ohne Nukleotide) oder zyklisch transkribierende Transkriptionskomplexe aufgetragen wurden (Vorinkubation mit allen Nukleotiden, aber ohne (- ^{32}P)GTP). Die Zusammensetzung der Proteinfractionen, die Konzentration der DNA und die weitere Durchführung entspricht Abb. 12.

A: *In vitro* Transkription: Test der Fraktionen der Glyzeringradienten mit nicht initiierten Transkriptionskomplexen (Vorinkubation ohne Nukleotide). Bahn 1: 7,5 μl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 50 μl der Fraktionen 1 bis 12 des Gradienten.

B: *In vitro* Transkription: Test der Fraktionen der Glyzeringradienten mit zyklisch transkribierenden Transkriptionskomplexen (Vorinkubation mit Nukleotiden). Bahn 1: 7,5 μl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 50 μl der Fraktionen 1 bis 12 des Gradienten.

C: Western Blot. Test der Fraktionen der Glyzeringradienten mit nicht initiierten Transkriptionskomplexen. Bahn 1: 125 μl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 900 μl der Fraktionen 1 bis 12 des Gradienten.

D: Western Blot. Test der Fraktionen der Glyzeringradienten mit zyklisch transkribierenden Transkriptionskomplexen. Bahn 1: 125 µl Auftragsfraktion, Bahnen 2 bis 13: je 900 µl der Fraktionen 1 bis 12 des Gradienten.

Deutlich ist, dass die Transkriptionsaktivität sowohl in der Stärke wie auch im Sedimentationsverhalten sehr ähnlich ist, sowohl untereinander, wie auch im Vergleich mit den nach sechs Nukleotiden arretierten Komplexen (vgl. Abb. 9A, 12A). Die maximale Aktivität fand sich erneut in den Fraktionen 6 (jeweils Bahn 7). Die zyklisch aktiven Transkriptionskomplexe erwiesen sich also offenbar als genauso stabil wie die noch nicht initiierten Komplexe. Die Auftragsfraktionen waren vergleichbar transkriptionsaktiv, wobei die Fraktion mit den zyklisch transkribierenden Komplexen bei diesem Test nur mit ($-^{32}\text{P}$)GTP supplementiert wurde, da die unmarkierten Nukleotide ja bereits im Ansatz enthalten waren.

Daraufhin wurden diese unterschiedlich generierten Komplexe einer Western Blot-Analyse unterzogen (Abb. 15C und D). TBP verhielt sich in seinem Sedimentationsverhalten identisch zu den zuvor getesteten Gradienten mit nach sechs Nukleotiden arretierten Komplexen (Abb. 12). Neben dem uninkorporierten TBP in den Fraktionen 1 und 2 (jeweils Bahnen 2 und 3) war erneut ein Maximum in Fraktion 5 (Bahn 6) beider Gradienten zu detektieren. TBP, und damit TFIIB β , liegt also fest mit der DNA assembliert im Transkriptionskomplex vor, unabhängig von der Phase des Transkriptionszyklus.

Die Verteilung von La innerhalb des Gradienten unterschied sich hingegen. Während in den noch nicht initiierten Komplexen (Abb. 15C) erneut das meiste La in der Fraktion 1 (Bahn 2) sedimentierte, war in den zyklisch aktiven Komplexen eine deutliche Verschiebung des Maximums zu Fraktion 2 (Abb. 15D, Bahn 3) zu beobachten. Es wurde hingegen kein La gefunden, das mit den Transkriptionskomplexen assembliert vorlag, da kein Kosedimentationsverhalten mit der Transkriptionsaktivität zu erkennen war, wie dies für TBP der Fall war. Vielmehr ist die Verschiebung um eine Fraktion darauf zurückzuführen, dass vor dem Auftrag der Komplexe auf den Gradienten bereits fertige RNA in La-RNPs komplexiert wurde. Diese RNA-La Komplexe haben offensichtlich einen höheren Sedimentationskoeffizienten als ungebundenes La.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Transkriptionskomplexe unabhängig von ihrer Zustandsform im Transkriptionszyklus vergleichbar aktiv und genügend stabil sind, um die Glyzeringradientenzentrifugation zu überstehen.

TFIIIB β bleibt während des gesamten Zyklus an die DNA gebunden. La ist zu keinem Zeitpunkt des Transkriptionszyklus mit dem Komplex assembliert.

3.1.11. Isolierte Transkriptionskomplexe sind reinitiationskompetent und lassen sich durch diverse Transkriptionsfaktoren, nicht aber durch La stimulieren

Es wurde von Maraia (1996) postuliert, dass die RNA Polymerase III ohne La nicht effizient transkribieren kann, da sie sowohl bei der Termination wie auch bei der Reinitiation auf die Aktivitäten dieses Proteins angewiesen sein soll. Daher sollte überprüft werden, ob die mittels Glyzeringradienten gereinigten Transkriptionskomplexe reinitiationskompetent waren. Es wurden daher nur Fraktionen verwendet, die aus dem distalen Bereich des Gradienten stammten und nachweislich La-frei vorlagen.

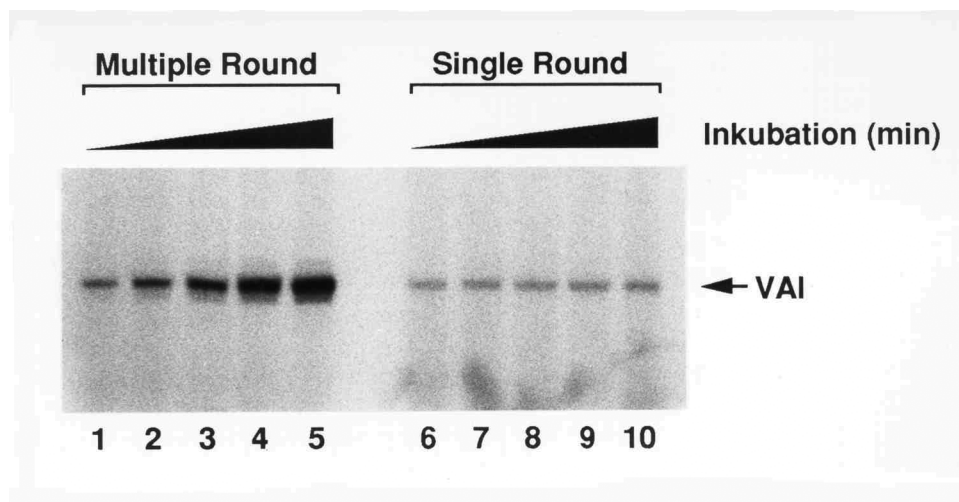


Abb. 16. In vitro Transkription. „Single Round“- und „Multiple Round“-Transkription isolierter Transkriptionskomplexe

50 μ l eines Gemisches aus den Fraktionen 8 und 9 eines typischen kompletten Glyzeringradienten wurden mit 10 μ g BSA versetzt und unter „Single Round“- oder „Multiple Round“-Bedingungen mit 10 μ Ci ($^{-32}$ P)GTP inkubiert (2.7.1.). Bahnen 1 bis 5: „Multiple Round“-Transkription für 2, 5, 10, 20 und 40 Minuten, Bahnen 6 bis 10: „Single Round“-Transkription für 2, 5, 10, 20 und 40 Minuten.

Abb. 16 zeigt vergleichend die RNA-Synthese von Transkriptionskomplexen, die mit GTP, CTP und ATP vorinkubiert wurden und somit nach sechs Basen arretiert waren. Diese Komplexe wurden dann wie üblich mit Nukleotiden sowie ($^{-32}$ P)GTP versehen und unterschiedlich lang inkubiert. Im linken Block wurden Reinitiationen zugelassen, im rechten Block hingegen durch Zugabe von Heparin ausgeschlossen.

Bereits nach zwei Minuten hatten fast alle Transkriptionskomplexe die Synthese der RNA abgeschlossen (Bahnen 1 und 6) und das Signal stieg unter „Single Round“-Bedingungen nicht weiter an (Bahnen 7 bis 10). Ohne Heparin kam es hingegen mit steigender Inkubationsdauer zu einem deutlichen Anwachsen der RNA-Menge, was auf effiziente Reinitiationsvorgänge zurückzuführen ist (Bahnen 2 bis 5). Die Transkriptionskomplexe waren also reinitiationskompetent.

Weiterhin wurde überprüft, ob isolierte Transkriptionskomplexe durch Zugabe von rekombinantem La in ihrer Transkriptionsaktivität stimuliert werden.

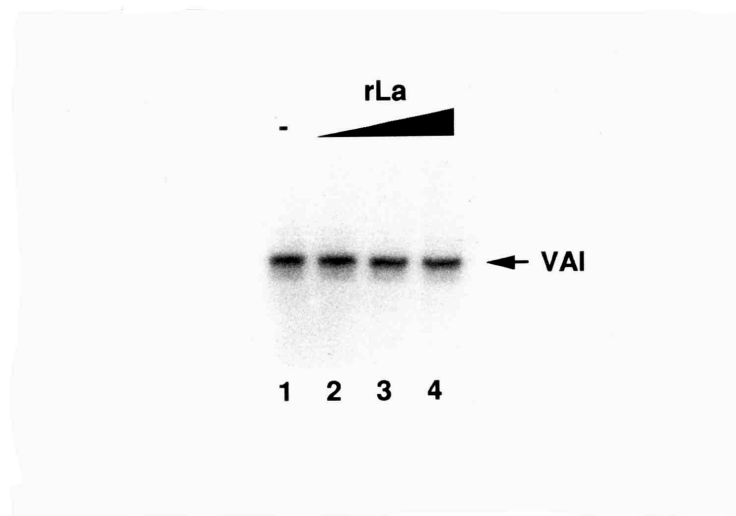


Abb. 17: Supplementation von rekombinantem La zu isolierten Transkriptionskomplexen

50 µl einer Fraktion 8 eines typischen kompletten Glyzeringradienten wurden mit 10 µg BSA versetzt, um stimulierende Effekte aufgrund erhöhter Proteinkonzentrationen auszuschließen, und wie üblich inkubiert. Bahn 1: ohne rekombinantes La, Bahnen 2 bis 4: 18,75, 37.5 und 75 ng rekombinantes La.

Die Zugabe von La führte zu keiner Stimulation der RNA Synthese, wie Abb. 17 zeigt. La-freie Transkriptionskomplexe wurden mit steigenden Mengen rekombinantem La unter „Multiple Round“-Bedingungen inkubiert. Diese Supplementation führte zu keinerlei Steigerung der RNA-Synthese.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist es, abgesehen von der Assemblierung des Initiationskomplexes, noch völlig unklar, ob und welche Funktionen die verschiedenen Transkriptionsfaktoren während der einzelnen Phasen der Transkription innehaben. Daher war es als erster Schritt für die Analyse solcher Aktivitäten interessant, ob gereinigte Transkriptionskomplexe durch Zugabe der verschiedenen Faktoren beeinflusst werden konnten. Daher wurden kreuzkontaminationsfreie Fraktionen zu isolierten Transkriptionskomplexen gegeben.

Um unspezifische Stimulationen auf Grund der Erhöhung der Proteinkonzentration auszuschließen, wurden die Komplexe (wie auch in Abb. 17) mit einem Überschuss an BSA versehen, bevor die Inkubation begonnen wurde.

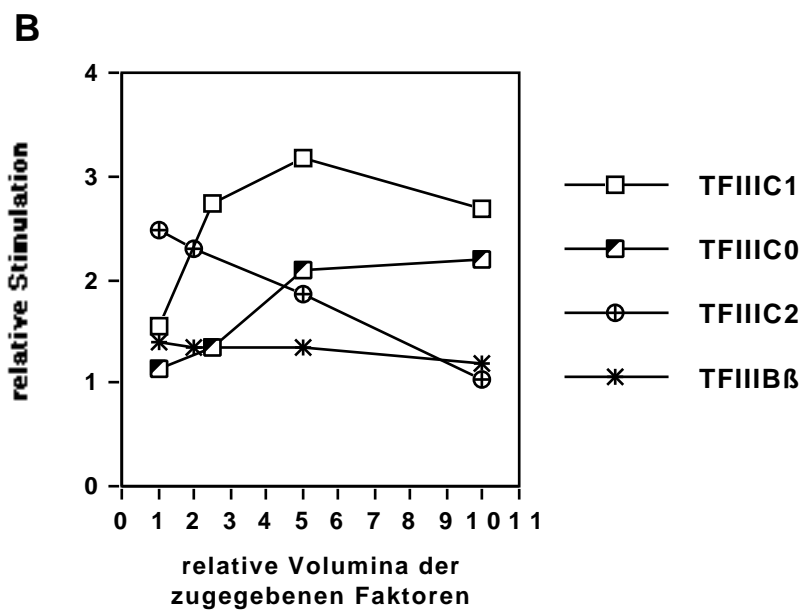
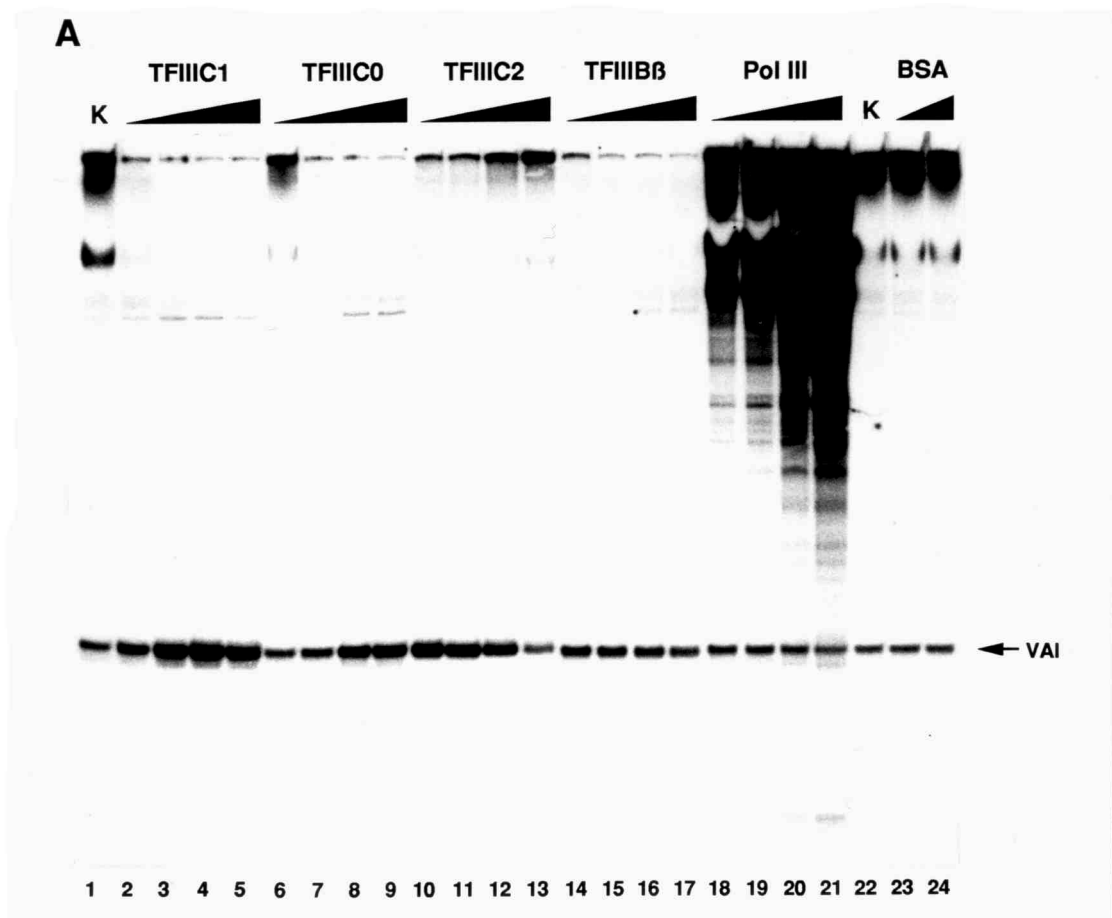


Abb. 18: Supplementation von isolierten Transkriptionskomplexen mit verschiedenen Transkriptions-faktoren

50 µl eines Gemisches aus den Fraktionen 5 bis 7 eines typischen kompletten Glyzeringradienten wurden mit 10 µg BSA versetzt, um stimulierende Effekte aufgrund erhöhter Proteinkonzentrationen auszuschließen und wie üblich inkubiert. Unterschiedliche Mengen verschiedener Transkriptionsfaktoren wurden zu den Ansätzen gegeben.

A: Bahnen 1 und 22: Kontrollen ohne zusätzliche Fraktion, Bahnen 2 bis 5: 1, 2,5, 5 und 10 µl TFIIC1 (MQ), Bahnen 6 bis 9: 1, 2,5, 5 und 10 µl TFIIC0 (MQ), Bahnen 10 bis 13: 0,5, 1, 2,5 und 5 µl TFIIC2 (MQ), Bahnen 14 bis 17: 0,5, 1, 2,5 und 5 µl TFIIB (SO₃⁻), Bahnen 18 bis 21: 0,5, 1, 2,5 und 5 µl Polymerase III (SO₃⁻), Bahnen 23 und 24: 5 und 10 µg BSA.

B: Graphische Darstellung der Veränderung der Transkriptionsaktivität in Abhängigkeit von der Menge der zugegebenen Faktoren.

Die Bahnen 1 und 22 zeigen das Grundsignal ohne weitere Zugabe von Faktoren. Eine weitere BSA-Zugabe veränderte die Transkriptionseffizienz nicht (Bahnen 23 und 24). Hingegen führte die Zugabe von 5 µl TFIIC1 zu einer Stimulation um Faktor 3,2 (Bahnen 2-5). TFIIC0 stimulierte zwar nicht ganz so stark (bis Faktor 2,2), diese Stimulation stieg aber mit der Menge der eingesetzten Fraktion stetig an (Bahnen 6 bis 9).

Ein gegensätzliches Bild zeigte sich bei Zugabe von TFIIC2. Während bereits 0,5 µl dieser Fraktion die Transkription um mehr als Faktor 2 stimulierte (Bahn 10), sank die Transkriptionseffizienz bei Erhöhung der Faktormenge wieder auf annähernd den Ausgangswert ab (Bahnen 11 bis 13).

TFIIB, der in der Hefe als der zentrale Reinitiationsfaktor beschrieben ist, konnte die Transkriptionskomplexe über den getesteten Bereich gleichbleibend, vergleichsweise aber nur geringfügig (maximal 40%) stimulieren. Keine Stimulation der spezifischen Transkription zeitigte hingegen die Supplementation von gereinigter Polymerase III. Die langen unspezifischen Vektortranskripte wurden hingegen massiv stimuliert.

TFIIC1 und auch TFIIC0 zeigen also eine massive Stimulation von isolierten Transkriptionskomplexen, wobei der Mechanismus dieser Stimulation noch unklar ist. Auch eine Supplementation mit TFIIC2 führte bei geringen Mengen zu einer Stimulation der Transkription, während TFIIB nur eine geringfügige und die Polymerase keinen stimulierenden Effekt zeigt.

3.2. Der Einfluss des 5'-nicht-kodierenden Bereiches am 5S-Gen.

Da die genomische Sequenz für das 5S-Gen erst 1990 von Sørensen et al. kloniert werden konnte, wurden vorher *in vitro* Untersuchungen an synthetischen Genkonstrukten durchgeführt, die aus der RNA-Sequenz abgeleitet worden waren und somit nur die kodierende Sequenz trugen, nicht aber die benachbarten 3'- und 5'-flankierenden Bereiche (Wingender et al., 1988). Diese Konstrukte können von der Polymerase III transkribiert werden. Allerdings ist die Transkriptionseffizienz dieser „synthetischen“ Gene deutlich geringer als die des genomischen 5S-Gens, welches die komplette 5'-flankierende Region im Bereich von -273 bis -1 trägt.

Bisherige Untersuchungen am genomischen 5S-Gen zeigten, dass die Deletion des 5'-Bereichs die Transkriptionsrate in der Tat dramatisch erniedrigt. So ist der hochkonservierte Cytosinrest bei Bp -1 vermutlich essentiell für eine effiziente RNA Synthese (Hallenberg et al., 1994). Eine weitere zentrale Rolle für die Expressionseffizienz des 5S-Gens in Säugern spielt eine 12 Basenpaar lange konservierte Sequenz, die D-Box (Bp -32 bis -21). Deletionen dieser Box führten zu einem dramatischen Einbruch der Transkription, während Deletionen stromaufwärts von Bp -32 keinen Einfluss zeigten (Nielsen et al., 1993).

3.2.1. Auswirkungen von Veränderungen des 5'-Bereiches des 5S-Gens auf die *in vitro* Transkription / Subklonierung der Plasmide pBEhe5S wt und pBEhe5S Δ D-Box

Um die Rolle der D-Box näher und unabhängig vom Einfluss des restlichen 5'-Bereichs von Bp -21 bis -1 untersuchen zu können und um Beeinflussungen durch unterschiedliche Vektorsequenzen auszuschließen, wurden zunächst zwei Plasmide subkloniert, die sich, abgesehen von einer unterschiedlichen Sequenz im Bereich der D-Box nicht weiter voneinander unterscheiden.

Aus dem Plasmid pBh5S wt, das das humane genomische 5S-Gen enthält (BamHI-SacI-Fragment) (Sørensen et al., 1990; Sørensen und Friederiksen, 1991; Nielsen et al., 1993), wurde mittels EheI-Restriktion ein nicht überhängendes 210 Basenpaarfragment ausgeschnitten (Übersicht 3, siehe auch 2.2.5.), auf einem 5%igen PAA Gel isoliert (2.3.3.), elektroeluiert (2.2.7.) und die DNA präpariert (2.2.3.). Dieses Fragment trägt die gesamte kodierende Sequenz des 5S-Gens,

weiterhin 75 Basen des nicht kodierenden Bereichs hinter dem Terminator sowie den Bereich von Bp -1 bis -12 aus dem 5'-flankierenden Bereich. Die D-Box ist nicht auf diesem Fragment erhalten.

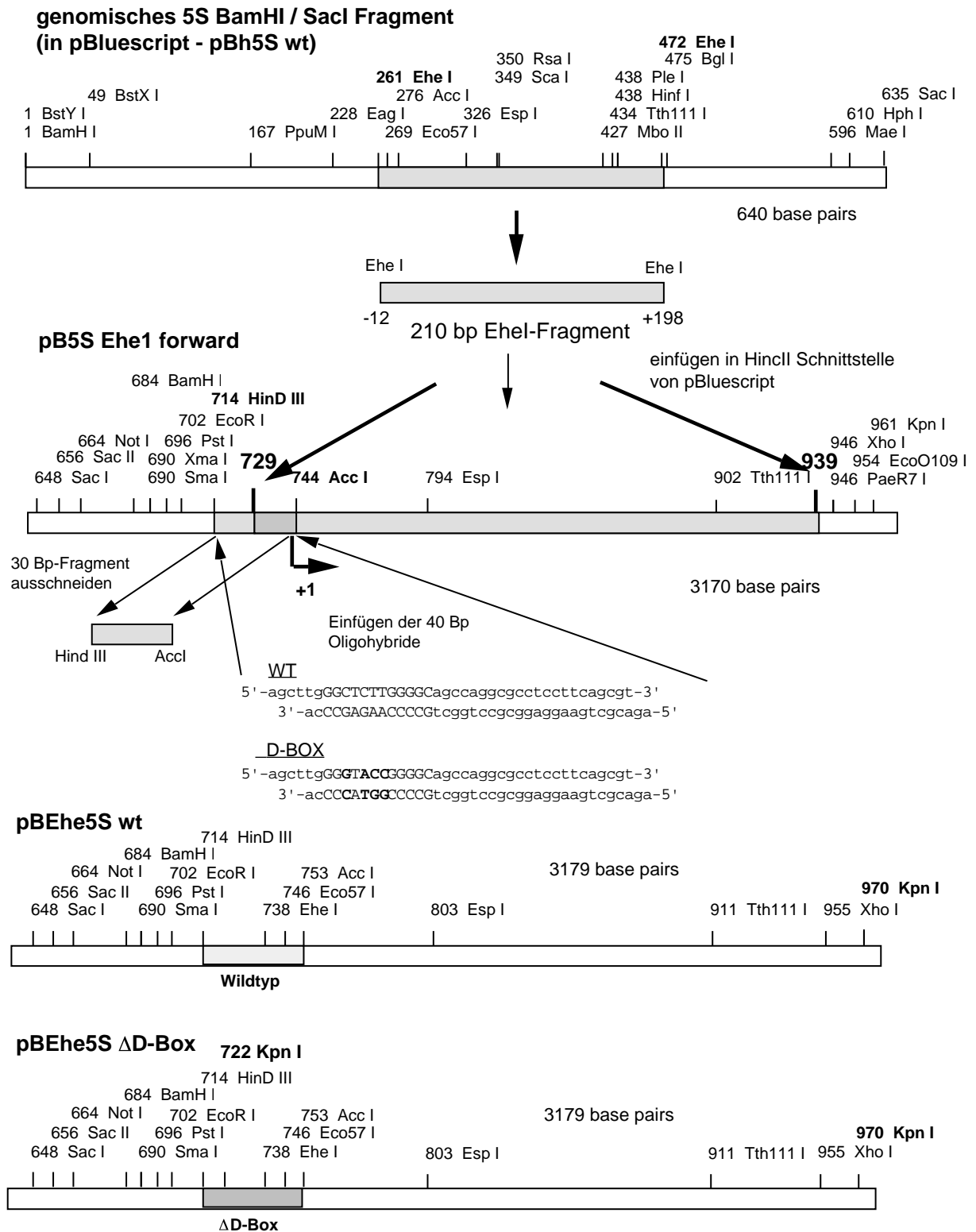
Das Fragment wurde mit einem HincII-linearisierten und dephosphorylierten (2.2.8.) pBluescript Vektor ligiert (2.2.10). Mehrere Klone wurden isoliert (2.2.12.) und einer Restriktionsanalyse (2.2.5.) unterzogen. Das Fragment konnte in beiden Orientierungen in das Plasmid integriert werden (pB5S Ehe1 forward, Orientierung EcoRI-Insert-KpnI) bzw. (pB5S Ehe1 backward, Orientierung KpnI-Insert-EcoRI). Es wurden positive Klone beider Orientierungen erhalten. Zur weiteren Subklonierung wurde das Plasmid pB5S Ehe1 forward verwendet.

Aus diesem Plasmid wurde nun ein HindIII-AccI-Fragment entfernt. HindIII schneidet stromaufwärts vom Startpunkt in der Vektorsequenz, die Schnittstelle von AccI liegt bei Position +2 (nicht-kodierender Strang) im kodierenden Bereich des Gens. Somit wurde der gesamte 5'-nicht-kodierende Bereich des 5S-Gens aus dem Plasmid entfernt. Die AccI-Schnittstelle des Vektors (pBluescript) ist durch die Insertion des Ehe1-Fragmentes zerstört worden, da sie mit der HincII-Schnittstelle überlappt.

In die HindIII-AccI-Lücke des Plasmids wurden hybridisierte (2.2.9.) komplementäre Oligos eingefügt und ligiert. Die Hybride trugen den stromaufwärtsliegenden Bereich des 5S-Gens, wobei entweder die D-Box als Wildtyp vorlag oder an 4 Stellen mutiert war (Übersichten 3 und 4). Die Enden der Hybride waren mit der HindIII- bzw. der AccI-Schnittstelle komplementär.

Positive Klone wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert und mittels Sequenzierung (2.2.13.) auf ihre korrekte Sequenz überprüft. Die erhaltenen Plasmide pB5SEhe wt und pB5SEhe D-Box unterschieden sich in ihrer gesamten Sequenz somit nur in 4 Basen innerhalb der D-Box. Übersicht 3 zeigt die graphische Darstellung der Subklonierungsstrategie von pBEhe5s wt / D-Box, Übersicht 4 zeigt die Sequenz des zentralen Teils des humanen genomischen 5S-Gens (A) sowie die unterschiedlichen 5'-flankierenden Bereiche der im Folgenden verwendeten 5S-Plasmide (B).

Übersicht 3: Subklonierung der Plasmide pBEhe5S wt / Δ D-Box



Übersicht 4: Übersicht über die DNA-Sequenzen der subklonierten 5S-Konstrukte

A: Die kodierende Sequenz des humanen 5S-Gens sowie die angrenzenden 5'- und 3'-Regionen

```

      -43  -38  -32          -21      Ehe I          +1AccI
5' -ggccGGGCCGggctgGGCTCTTGGGGCagccaGGCGCCtccttcagcgtctacggccataccaccctgaacg
      SP1?          D-Box          IvE

                        +50          +64+67  +72      +80          +97
cgcccgatctcgtctgatctcggaAGCTAAGCAGGGTCGggCCTGGTtagtactTGGATGGGAGACCGCCTGgga
                        A-Box          IE          C-Box

                        +119
ataccgggtgctgtaggcTTTTTctttggctttttgctgtttctttcctttcttccagacgg-3'
                        Terminator

```

B: Vergleich der 5'-Bereiche der 5S-Konstrukte:

pBh5S wt

```

                                                +1
ggccGGGCCGggctgGGCTCTTGGGGCagccaGGCGCCtccttcagcgtctacggccataccaccctgaacg-3'
      SP1?          D-Box          IvE

```

pBh5S -5'

```

                                                +1
.....Vektorsequenz.....gtctacggccataccaccctgaacg-3'

```

pBEhe5S wt

```

                                                +1
.....tgGGCTCTTGGGGCagccaGGCGCCtccttcagcgtctacggccataccaccctgaacg-3'

```

pBEhe5S ΔD-Box

```

                                                +1
.....tgGGTACCGGGGCagccaGGCGCCtccttcagcgtctacggccataccaccctgaacg-3'

```

Abb. 19 zeigt einen Vergleich der Transkription der verschiedenen 5S-Plasmide mit zytoplasmatischem Extrakt. In den ersten drei Bahnen wurden mit steigenden Mengen S100 das genomische 5S-Gen (pBh5S wt) transkribiert und zum Vergleich in den Bahnen 4 bis 6 entsprechende Mengen einer Mutante, welcher der gesamte 5'-Bereich fehlt (pBh5S-5').

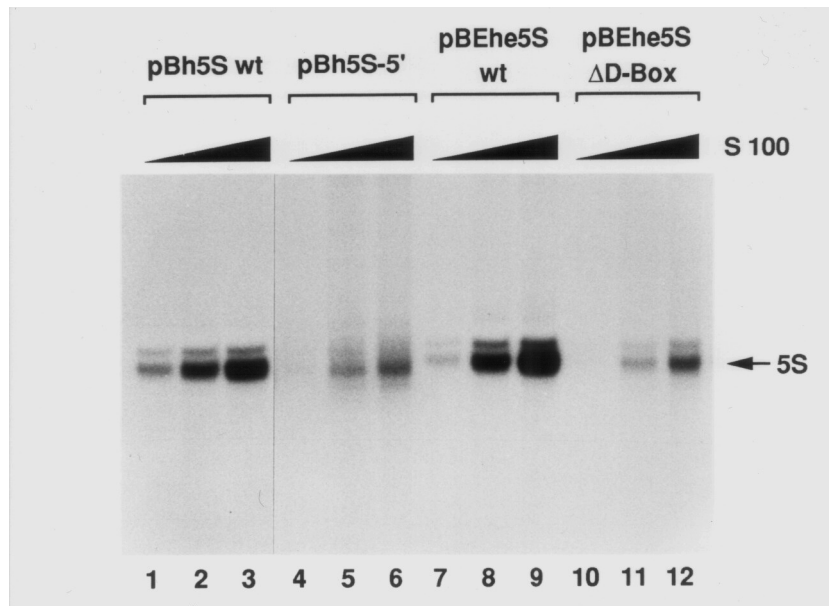


Abb. 19: *In vitro* Transkription. Aktivitätsvergleich verschiedener 5S-Genkonstrukte

4 verschiedene Plasmide, die das humane genomische 5S-Gen tragen, aber Unterschiede im 5'-flankierenden Bereich aufweisen, wurden auf ihre Transkriptionsaktivität getestet. Bahnen 1-3: 1 µg pBh5S wt, Bahnen 4-6: pBh5S-5', Bahnen 7-9: 1 µg pBEhe5S wt, Bahnen 10-12: 1 µg pBEhe5S D-Box. Bahnen 1, 4, 7 und 10: 2,5 µl S100, Bahnen 2, 5, 8 und 11: 5 µl S100, Bahnen 3, 6, 9 und 12: 7,5 µl S100.

Deutlich ersichtlich ist, dass die Transkriptionseffizienz an der Mutante nur etwa 25% zu der am Wildtyp betrug. Zusätzlich war ein unschärferes Transkriptionssignal zu detektieren. Letzteres ist vermutlich auf eine inkorrekte Initiation zurückzuführen.

Zum Vergleich sind auch die neu subklonierten Plasmide getestet worden. Wie in den Bahnen 7 bis 9 ersichtlich ist, wurde das Konstrukt pBEhe5S wt ähnlich effizient transkribiert wie pBh5S wt. Auch die Längen der synthetisierten RNAs sind identisch. Zum Vergleich wird das Plasmid pBEhe5S D-Box (Bahnen 10-12) deutlich schwächer transkribiert (<20% im Vergleich zu pBEhe5S wt). Dabei ist aber die Länge der synthetisierten RNA identisch mit der RNA von pBEhe5S wt und auch von pBh5S wt. Dies lässt darauf schließen, dass die D-Box nicht für die korrekte Startpunktfestlegung der RNA-Synthese benötigt wird.

3.2.2. Es ist nicht möglich, im Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) D-Box-spezifische Protein-DNA-Komplexe an 5S-Fragmenten nachzuweisen

Da die D-Box zwischen mehreren Säugetieren zu einhundert Prozent konserviert vorliegt und nur ihre Lokalisation um einige Basen verschoben ist, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um die Erkennungssequenz eines primär DNA-bindenden Proteins handelt. Daher wurden EMSA-Experimente an XhoI/BamHI-Fragmenten der Konstrukte pBEhe5S wt und als Negativkontrolle an pBEhe5S D-Box durchgeführt. Es konnte aber, ebenso wie in früheren Untersuchungen von Frauke Härtel (Härtel, 1995), kein D-Box spezifischer Protein-DNA-Komplex nachgewiesen werden, obwohl auch mit teilgereinigten Fraktionen (PC-Fractionen) gearbeitet wurde. Unter den gleichen Bedingungen war aber an beiden Matrizen ein spezifischer TFIIIA-5S-Komplex unter Verwendung der Fraktionen PCD und PCAD detektierbar (Daten nicht gezeigt, zur Durchführung siehe 2.8.1.).

Da die D-Box relativ nahe am Initiator lokalisiert ist (-21 bis -32), wurde erwogen, ob ein möglicher D-Box-bindender Faktor nur dann die Sequenz erkennen und an sie binden kann, wenn die DNA in diesem Bereich aufgeschmolzen und damit einzelsträngig vorliegt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Phosphocellulosefraktionen mit zwei verschiedenen Oligonukleotiden inkubiert, die jeweils einen Strang der D-Box trugen, um mögliche spezifische Interaktionen detektieren zu können. Zum Vergleich wurden Oligos eingesetzt, die die oben beschriebene Mutation trugen (siehe 2.8.2.).

In der Tat konnten an allen Oligos etliche Komplexe festgestellt werden, von denen sich aber keiner als D-Box spezifisch herausstellte. Auch konnte mit keinem der beiden wt-Oligos eine 5S-Transkription inhibiert oder stimuliert werden (Daten nicht gezeigt).

3.2.3. Die Superhelikalität der Matrize ist keine Voraussetzung für die Funktion der D-Box

Die unterschiedliche Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp-5S-DNA und DNA mit deletierter oder mutierter D-Box wurde bisher nur an superhelikaler Plasmid-DNA gezeigt. Da alle bisherigen Bindungsstudien hingegen an linearer DNA durchgeführt

wurden, sollte überprüft werden, ob der stimulierende Effekt der D-Box auf die Transkriptionseffizienz auch bei Verwendung von linearer DNA auftritt.

Daher wurden XhoI/BamHI-Fragmente aus den Plasmiden pBEhe5S wt und pBEhe5S D-Box präpariert und mittels PAA-Gel-Elektrophorese (2.3.3.) auf ihre Konzentration und Reinheit untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese Fragmente entsprechen den Fragmenten, die zuvor im EMSA (mit ds-DNA) eingesetzt worden sind und tragen das gesamte Insert der Plasmide sowie einen kleinen Teil des Polylinkers (siehe auch Übersicht 3). Anschließend wurden die Fragmente als Matrizen für eine *in vitro* Transkription mit S100 eingesetzt.

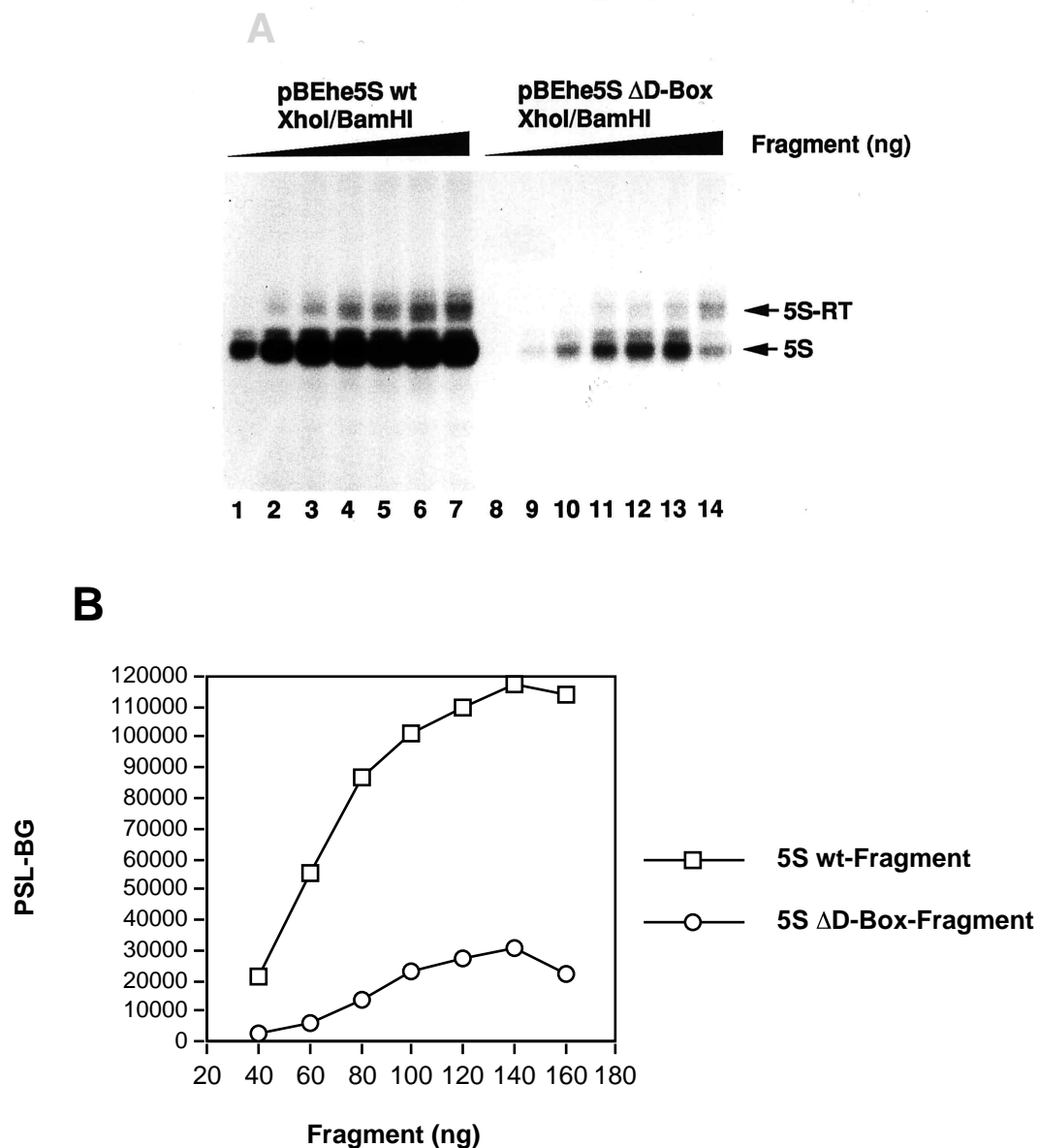


Abb. 20: *In vitro* Transkription an linearisierter DNA (Fragment-DNA)

Vergleichend wurden die XhoI/BamHI-Fragmente aus den Plasmiden pBEhe5S wt und pBEhe5S D-Box mit S100 transkribiert.

A: Autoradiographie. Bahnen 1 bis 7: 5 µl S100 an 40, 60, 80, 100, 120, 140 und 160 ng 5S-wt-Fragment, Bahnen 8 bis 14: 5 µl S100 an 40, 60, 80, 100, 120, 140 und 160 ng 5S- D-Box-Fragment.
B: graphische Darstellung der quantitativen Auswertung am Phosphorimager. Volle-Länge-Transkripte und RT-Transkripte wurden addiert.

In Abb. 20 ist die Transkription der beiden 5S-Konstrukte gezeigt. Es wurde eine Titration von 40 bis 160 ng Fragment durchgeführt. Bis ca. 140 ng (Bahn 6) konnte jeweils eine Verstärkung der Transkription erreicht werden, eine weitere Erhöhung der Fragmentmenge führte zu einer leichten Abnahme der Transkriptionsrate (Bahn 7, siehe auch Abb. 20B). Neben dem Hauptsignal, das in der Länge dem bekannten mit Plasmid synthetisierten Produkt entspricht, entstand zusätzlich ein etwas längeres Transkript. Vermutlich beruht es auf ein Durchlesen (read through, RT) der Polymerase über den Terminator hinaus. Im 3'-Bereich des Gens liegt eine ausgedehnte Thymin-reiche, terminatorähnliche Sequenz (siehe Übersicht 4A), die vermutlich für diese unspezifische Termination verantwortlich ist. Für die quantitative Analyse der Transkription in Abb. 20B wurden beide Signale addiert. Sehr ähnlich verhielt sich das mutierte Fragment, auch hier wurde das Transkriptionsmaximum bei 140 ng erreicht (Bahn 13). Allerdings reichte die maximale Transkriptionseffizienz nur 25% des Wertes des wt-Fragmentes. Auffällig ist, dass bei der höchsten Matrizenmenge das längere Transkript stärker wurde als das normale Syntheseprodukt. Der Grund für diesen Effekt konnte nicht geklärt werden.

Die Superhelikalität der DNA ist also keine Voraussetzung für den stimulierenden Effekt der D-Box. Auch in der Fragmenttranskription wird das Wildtyp-Gen stärker transkribiert als die D-Box-Mutante, obwohl in EMSA-Experimenten am gleichen Fragment (siehe 3.2.2.) kein spezifischer DNA-Protein-Komplex zu detektieren ist.

3.2.4. Die unterschiedliche Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und D-Box-Mutante ist abhängig vom verwendeten Transkriptionssystem

Alle bisherigen Untersuchungen zur Funktion der D-Box basieren auf Transkriptionsexperimenten unter Verwendung grober Zellextrakte. Daher wurde überprüft, ob der Einsatz von teilgereinigten Fraktionen bzw. gereinigter Transkriptionsfaktoren einen Einfluss auf die Differenz der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und D-Box-Mutante hat. Dabei zeigte sich durchgängig, dass Transkriptionen, die mit zytoplasmatischem Extrakt durchgeführt wurden, die

Transkriptionseffizienz an der Mutante nur zwischen 10 und 25% relativ zu jener an der Wildtyp-DNA betrug (siehe Abb. 19, weitere Daten nicht gezeigt). Wurde hingegen ein teilgereinigtes Transkriptionssystem, bestehend aus PCB, PCC und PCAD verwendet, verminderte sich der Unterschied deutlich und lag, in Abhängigkeit von den verwendeten Fraktionen und ihrer Stöchiometrie im Bereich von 30 bis 60% (siehe z.B. Abb. 21). Es lag daher die Vermutung nahe, dass ein Faktor durch die Phosphocellulose-Chromatographie partiell abgetrennt wurde, der durch Interaktion mit der D-Box spezifisch das Wildtyp-5S-Gen, nicht aber die D-Box-Mutante stimuliert. Daher wurde überprüft, ob sich in der PCA oder der PCD eine Aktivität befindet, die spezifisch nur die Transkription am Wildtyp-5S-Gen stimuliert. Die Zugabe der PCA oder der PCD zu einem PCB-PCC-PCAD Rekonstitutionssystem zeigte keine Stimulation der Transkription (Daten nicht gezeigt). Die PCA wurde einer Q-Sepharose- und alternativ einer EDF-Chromatographie unterzogen (2.6.6.5.). Die PCD wurde über MonoQ-Chromatographie aufgetrennt (2.6.6.5.). In keiner der daraus resultierenden Fraktionen konnte eine solche Aktivität, die spezifisch das wt-Gen stimuliert, reproduzierbar identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Auch der Versuch, einen D-Box-spezifischen stimulierenden Faktor aus dem Rekonstitutionssystem abzutrennen, zeigte keinen Erfolg. Der Einsatz eines vollständig rekonstituierten Transkriptionssystems, bestehend aus einer TFIIIA-Fraktion (PCAD), TFIIIB β (SO_3^-), Polymerase (SO_3^-), TFIIIC1 (MQ) und TFIIIC2 (MQ) (siehe 2.6.6.) führte zu keiner weiteren signifikanten Verringerung des Unterschiedes der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und Mutante, verglichen mit dem teilrekonstituierten System aus PCB, PCC und PCAD. Hingegen war der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante abhängig von der Stöchiometrie der eingesetzten Faktoren (siehe 3.2.7.).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass alle Bemühungen, einen D-Box-bindenden Faktor durch chromatographische Reinigung aus dem Rekonstitutionssystem abzutrennen bzw. zu isolieren, nicht erfolgreich waren. Es wurde daher auf anderem Wege überprüft, ob die Existenz eines solchen eigenständigen Faktors überhaupt wahrscheinlich ist. Zu diesem Zweck wurde eine Methode zur Transkription an immobilisierten DNA-Fragmenten etabliert, welche das zu transkribierende Gen trugen.

DNA-Fragmente wurden über PCR (2.2.14.) synthetisiert, wobei die Plasmide pBEhe5S wt / D-Box als Matrize dienten. Einer der verwendeten Primer trug einen

Biotin-Rest am 5'-Ende. Das somit entstandene biotinylierte Fragment wurde an Neutravidin-Agarose-Beads gekoppelt, und anschließend wurde das Säulenmaterial als Matrize für die 5S-Transkription eingesetzt (2.7.2.).

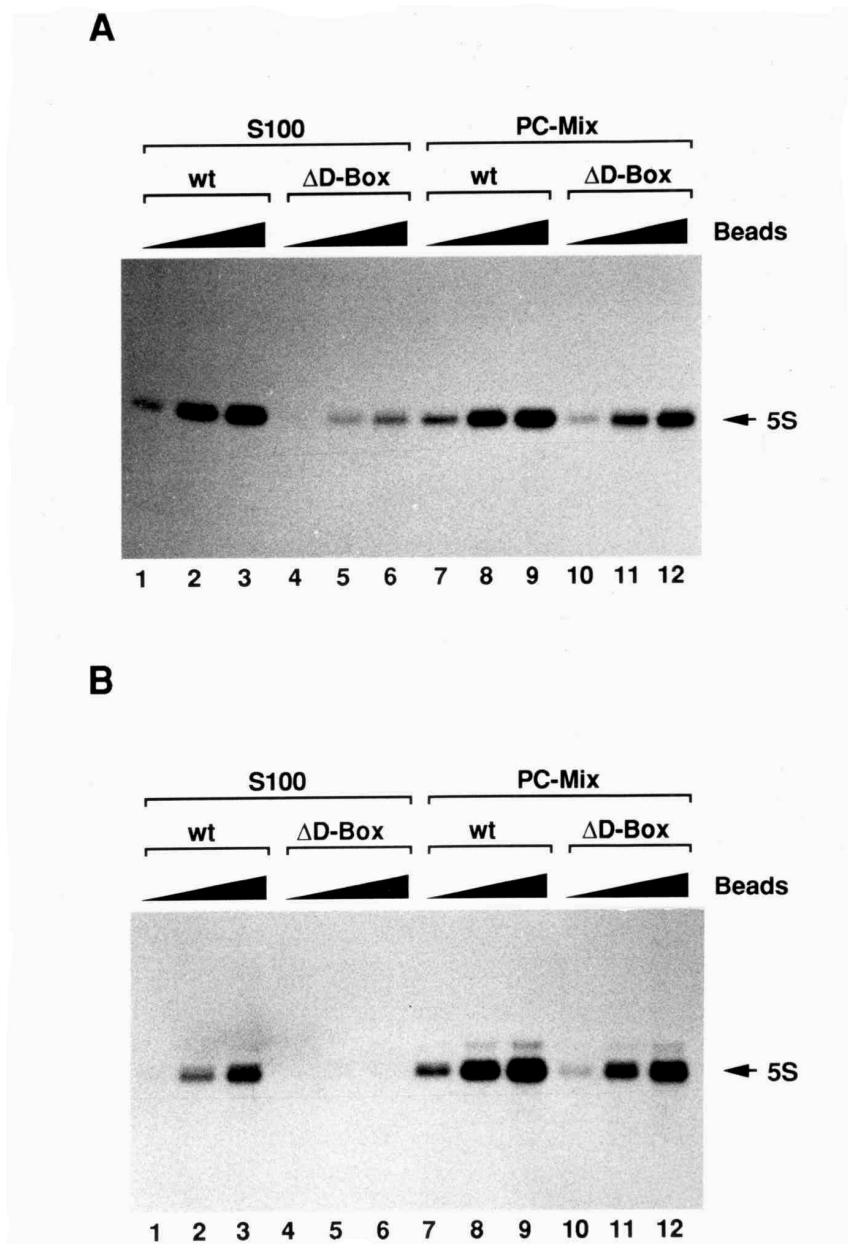


Abb. 21. Vergleich der Transkriptionsaktivität an immobilisierten 5S-wt- und 5S-ΔD-Box Fragmenten

PCR-erzeugte 5S-rRNA-Fragmente, die an Neutravidin-Beads immobilisiert wurden, wurden als Matrize für eine *in vitro* Transkription eingesetzt.

A: Inkubation der Transkription für 90 Minuten. Bahnen 1-6: je 5 μ l S100, Bahnen 7-12: 8 μ l PCB, 20 μ l PCC und 10 μ l PCAD, Bahnen 1-3 und 7-9: 2, 6 und 10 μ l Beads, gekoppelt mit 5S-wt-Fragment, Bahnen 4-6 und 10-12: 2, 6 und 10 μ l Beads, gekoppelt mit 5S- D-Box Fragment.

B: Bahnenbelegung wie A, aber Inkubation zunächst ohne Nukleotide für 45 Minuten. Danach wurde der Überstand von den Beads abgenommen und die Beads nach einmaligem Waschen wieder in

Transkriptionspuffer aufgenommen. Die Nachinkubation erfolgte dann für 90 Minuten nach Zugabe von Nukleotiden und ($-^{32}\text{P}$)GTP.

In Abb. 21A wurde die Transkription von D-Box-Mutante und Wildtyp bei drei verschiedenen Mengen Bead-gekoppelter DNA getestet. Auch an der immobilisierten DNA wurde ein deutlicher Unterschied in der Transkriptionseffizienz zwischen 5S-Wildtyp und Mutante detektiert (linker Block, Bahnen 1-12). Bei allen drei Mengen Beads wurde das Wildtyp-Gen mehr als fünfmal so stark transkribiert wie das mutierte Gen (vergleiche Bahnen 1-3 mit 4-6). Dieser Unterschied wurde auch in diesem Experiment deutlich geringer bei Verwendung des teilrekonstituierten PCB/C/AD-Transkriptionssystems. In diesem System war die Transkription am Wildtyp nur noch etwa doppelt so stark wie an der Mutante (vergleiche Bahnen 7-9 mit 10-12).

Da die Transkription an immobilisierter DNA erlaubt, einmal assemblierte Transkriptionskomplexe zu waschen und dabei nichtinkorporierte Proteine weitgehend abzutrennen, wurden im zweiten Telexperiment (Abb. 22B) entsprechende Ansätze zunächst ohne Nukleotide für 45 Minuten vorinkubiert, um die Formation der Transkriptionskomplexe zu ermöglichen. Danach wurden die Überstände entfernt, die Beads einmal mit Transkriptionspuffer gewaschen und anschließend mit neuem Transkriptionspuffer, Nukleotiden und ($-^{32}\text{P}$)GTP nachinkubiert.

Auch in diesem Telexperiment wurde der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante hinsichtlich ihrer Transkriptionseffizienzen untersucht und mit den Ergebnissen aus Abb. 21A verglichen. Im mit S100 vorinkubierten System war die Transkription am Wildtyp wieder etwa fünfmal so stark wie an der Mutante. Die an der Mutante erzeugten Transkripte sind nur bei sehr langen Expositionen des Röntgenfilms sichtbar. Die Transkription an der höchsten Menge Beads mit mutiertem 5S-Gen fiel ungewöhnlich schwach aus. Dies ist vermutlich auf einen technischen Fehler zurückzuführen. Die Transkription im PCB/PCC/PCAD System veränderte sich im gewaschenen System ebenfalls nicht signifikant. Wiederum wurde das Wildtyp-Gen etwas mehr als doppelt so stark transkribiert wie die Mutante.

Eine etwaige Aktivität, die für das unterschiedliche Verhalten der beiden Gen-Konstrukte in der Transkription verantwortlich ist, konnte also durch das Waschen nicht aus dem Ansatz entfernt werden, oder eine solche Komponente könnte seine Wirkung bereits während der Assemblierung der Transkriptionskomplexe vollständig

erbringen. Ansätze, in denen Transkriptionskomplexe mit S100 assembliert wurden, zeigten auch nach Waschen der Komplexe einen weitaus größeren Unterschied in ihrer Transkriptionsaktivität zwischen Wildtyp und Mutante als solche, die mit dem PC-System vorinkubiert wurden.

3.2.5. Eluate von assemblierten VAI-Transkriptionskomplexen sind unterschiedlich aktiv an pBEhe5S wt und pBEhe5S Δ DBox

Der Transkriptionskomplex am 5S-Gen ähnelt in seiner Zusammensetzung den Transkriptionskomplexen der anderen klassischen Pol III Gene. Abgesehen von TFIIIA, der nur an 5S aktiv ist, benötigen alle diese Gene dieselben Transkriptionsfaktoren. Die D-Box ist aber nur im Falle des 5S-Gens vorhanden. Daher wurde überprüft, ob die Bestandteile von Transkriptionskomplexen, die am VAI-Gen assembliert wurden, nach Elution dieser Komplexe von der DNA an den 5S-Genkonstrukten aktiv waren und ob eine unterschiedliche Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und D-Box-Mutante festzustellen war. Daher wurden an einem immobilisierten VAI-DNA-Fragment zunächst mit PCB und PCC Transkriptionskomplexe assembliert. Diese Komplexe wurden dann gewaschen, über ein Glyzerinkissen von nicht-inkorporierten Transkriptionsfaktoren abgetrennt und nachfolgend mit Salz behandelt. Danach enthielt der Überstand der Beads die eluierten Transkriptionsfaktoren. Dieser Überstand wurde durch Verdünnung wieder in einen niedrigeren Salzbereich gebracht und an Plasmiden, die verschiedene Gene trugen, auf ihre Transkriptionsaktivität getestet (siehe 2.7.2.3.).

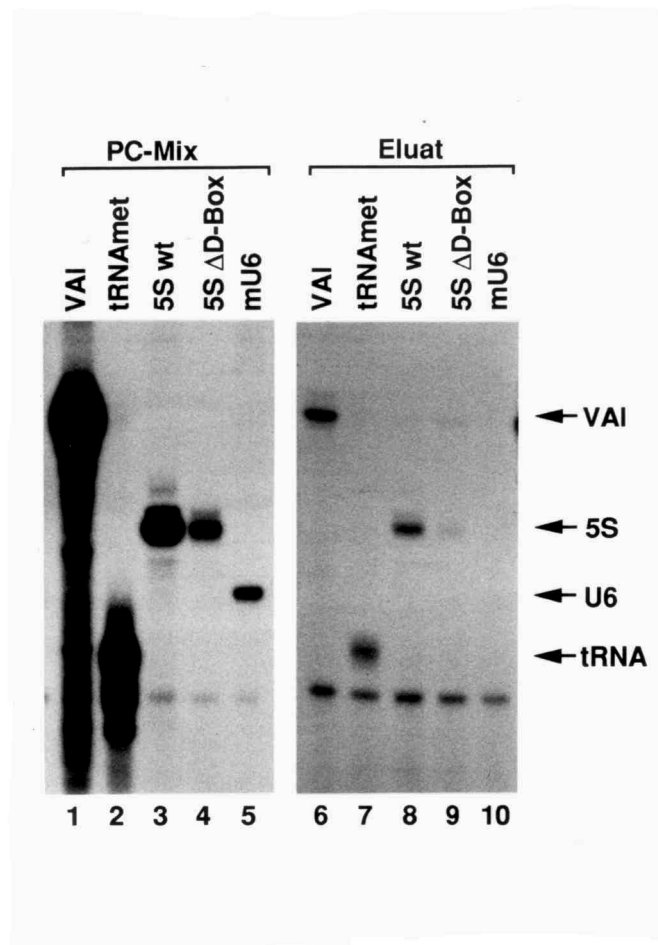


Abb. 22. *In vitro* Transkription. Transkriptionsaktivität von Eluaten aus VAI-Transkriptionskomplexen

An immobilisiertem VAI-Fragment wurden zunächst Transkriptionskomplexe assembliert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Transkriptionskomplexe nach (2.7.2.3.) isoliert und von der DNA eluiert. Diese Eluate wurden dann an verschiedenen Genen (Plasmid-DNA) auf Transkriptionsaktivität getestet. Außerdem wurden Kontrolltranskriptionen an diesen Genen mit PCB und PCC erstellt. An pBEhe5S wt und pBEhe5S D-Box wurden sowohl bei Verwendung von PCB/PCC wie auch der Eluate zusätzlich 10 µl einer PCAD in die Transkription eingesetzt.

Bahnen 1-5: Kontrolltranskriptionen mit 7,5 µl PCB und 20 µl PCC sowie ggf. 10 µl PCAD. Bahnen 6-12: Transkription mit je 5 µl VAI-Eluat und ggf. 10 µl PCAD. Bahnen 1 und 6: Transkription an 1 µg pUVAI, Bahnen 2 und 7: an 1 µg pUht_{met}, Bahnen 3 und 8: an 1 µg pBEhe5S wt Bahnen 4 und 9: an 1 µg pBEhe5S D-Box, Bahnen 5 und 10: an 1 µg pUmU6_{0,34}.

In Abb. 22 sind im linken Block Kontrolltranskriptionen aufgetragen, die mit PCB und PCC an Plasmiden durchgeführt wurden, welche die Gene pUVAI (Bahn 1), pUht_{met} (Bahn 2), pBEhe5S wt (Bahn 3), pBEhe5S D-Box (Bahn 4) sowie pUmU6_{0,34} (Bahn 5) trugen. Zu den beiden 5S-Genkonstrukten wurde zusätzlich eine PCAD-Fraktion gegeben.

Das Rekonstitutionssystem war sehr aktiv an den Genen für VAI-RNA und tRNA und gut aktiv am U6-Gen. Sehr gut war auch die erzielte Transkription am Wildtyp-5S-Gen. Hierzu verglichen wurde die Mutante nur mit einer relativen Effizienz von 15% transkribiert. Dieser deutlich größere Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante im Vergleich zu dem teilgereinigten System in Abb. 21 ist auf die Verwendung anderer PC-Fraktionen zurückzuführen.

Der rechte Block (Bahn 6-10) zeigt die Transkription an den verschiedenen Genen unter Verwendung der VAI-Komplexeluat, die wie oben beschrieben, präpariert wurden. Da TFIIIA nicht Bestandteil des VAI-Transkriptionskomplex ist, musste die Reaktion an den 5S-Genkonstrukten mit einer PCAD-Fraktion supplementiert werden.

Die Eluate waren gut aktiv am VAI- und tRNA-Gen (Bahnen 6 und 7). Hingegen konnte am 5'-regulierten U6-Gen keine Transkriptionsaktivität nachgewiesen werden (Bahn 10).

An pBEhe5S wt konnte eine gute Transkriptionsaktivität bei Verwendung von gereinigtem TFIIIA und dem eluierten VAI-Transkriptionskomplex erzielt werden. Diese betrug hingegen an pBEhe5S Δ D-Box im Vergleich nur 15%. Der Unterschied in der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und Mutante fiel also bei Verwendung der VAI-Transkriptionskomplexeluat plus PCAD genauso hoch aus wie bei Verwendung von PCB, PCC und PCAD. Kontrollen ohne TFIIIA-Zugabe zeigten, wie erwartet, keine Transkriptionsaktivität.

3.2.6. Eluierte Transkriptionskomplexe von Wildtyp- und Δ D-Box-5S-DNA-Fragmenten zeigen weitgehend identische Transkriptionseigenschaften

Das vorangegangene Experiment zeigt deutlich, dass die unterschiedliche Transkriptionseffizienz von pBEhe5S wt und pBEhe5S Δ D-Box bei Verwendung von Transkriptionsfaktoren, die aus einem Transkriptionskomplex eines Gens mit einer anderen Promotorstruktur ohne D-Box eluiert wurden, trotzdem erhalten bleibt. Nun sollte untersucht werden, wie sich das Fehlen oder Vorhandensein der D-Box während der Komplexassemblierung am 5S-Gen auf die Zusammensetzung der Transkriptionsfaktoren auswirkt, die in den Komplex integriert werden. Daher wurden alternativ an immobilisierten 5S-wt- und 5S- Δ D-Box-DNA-Fragmenten Transkriptionskomplexe assembliert. Die Transkriptionskomplexe wurden wie in

2.7.2.3. beschrieben präpariert und eluiert. Die Eluate wurden dann auf ihre Transkriptionsaktivität an drei verschiedenen Matrizen untersucht. Die Transkription erfolgte an pBEhe5S wt und pBEhe5S Δ D-Box sowie zur Kontrolle an VAI.

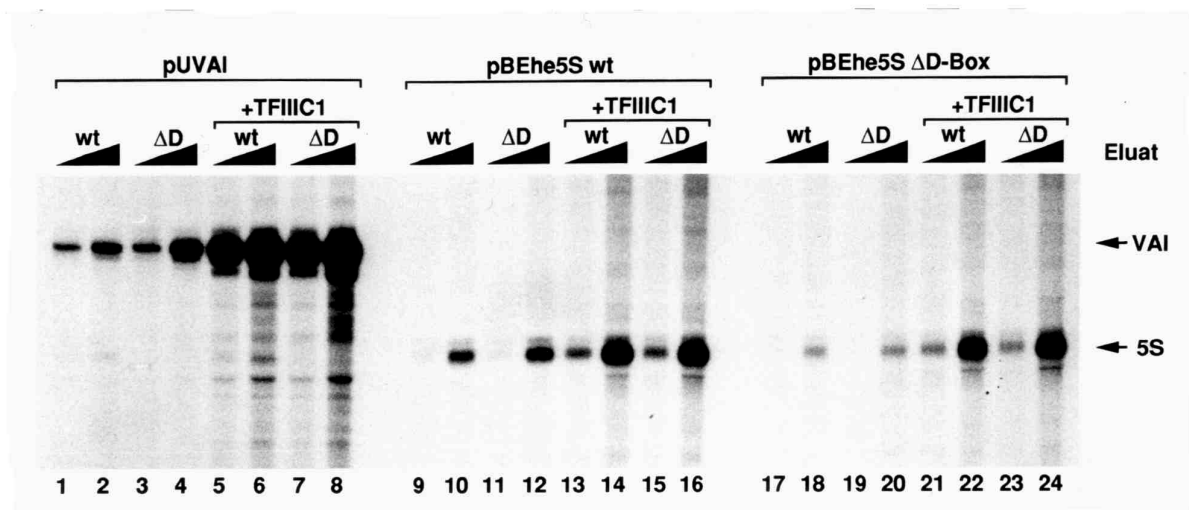


Abb. 23: Aktivitätsvergleich der Eluate von an 5S-wt und 5S- Δ D-Box assemblierten Transkriptionskomplexen

An immobilisiertem 5S-wt- bzw. Δ D-Box-DNA-Fragmenten wurden mit 8 μ l PCB, 20 μ l PCC sowie 10 μ l PCAD Transkriptionskomplexe assembliert, vom Überstand abgetrennt, präpariert und eluiert. Jeweils 5 und 10 μ l des angegebenen Eluats wurden an Plasmid-DNA transkribiert. Bahnen 1-8: Transkription an pUVAI, Bahnen 9-16: an pBEhe5S wt, Bahnen 17-24: an pBEhe5S Δ D-Box. Bahnen 1-4, 9-12 und 17-20: Transkription mit angegebenem Eluat ohne zusätzliche Proteinfractionen, Bahnen 5-8, 13-16 und 21-24: Transkription mit angegebenem Eluat plus 5 μ l TFIIIC1.

Sowohl das 5S-wt- wie auch das 5S- Δ D-Box-Eluat zeigten gute Transkriptionsaktivität an pUVAI (vergleiche Bahnen 1 und 2 mit 3 und 4), wobei das Δ D-Box-Eluat sogar noch etwas aktiver war. Wurde zu diesen Ansätzen zusätzlich 5 μ l TFIIIC1 hinzugegeben, wurde sowohl das Wildtyp-Eluat wie auch das Δ D-Box-Eluat drastisch (ca. Faktor 10-15) stimuliert (Bahnen 5 bis 8).

Wurden die 5S-Eluate erneut in einer 5S-Transkription eingesetzt, so ergab sich, dass das Δ D-Box-Eluat an pBEhe5S wt ein wenig stärker transkriptionsaktiv war als das Wildtyp-Eluat (vgl. 11 und 12 mit 9 und 10), während beide Eluate annähernd gleich aktiv waren an pBEhe5S Δ D-Box (vergleiche Bahnen 17 und 18 mit 19 und 20). Es konnten also keine Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass während der Komplexassemblierungsphase an der Δ D-Box-mutierten Fragment-DNA eine geringere Anzahl oder weniger aktive Transkriptionskomplexe gebildet wurden.

Unabhängig davon, welches Eluat eingesetzt wurde, wurde in der nachfolgenden Transkription das Plasmid pBEhe5S D-Box nur mit ca. 40% der Effizienz des Wildtyp-Plasmids transkribiert. Durch TFIIIC1-Zugabe wurde die Transkription am Wildtyp-Plasmid um ca. Faktor 4 stimuliert, am mutierten Plasmid hingegen um ca. Faktor 7. Das bedeutet, dass der Unterschied der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp- und mutiertem Plasmid bei Anwesenheit von zusätzlichem TFIIIC1 deutlich verringert wurde. Die Mutante wurde nun mit ca. 70% Effizienz relativ zum Wildtyp transkribiert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die 5S-Transkription auch dann bei intakter D-Box stärker ausfällt, wenn eluierte Transkriptionsfaktoren von einem D-Box-mutierten DNA-Fragment verwendet wurden. Auch scheint die Anwesenheit der D-Box bei der primären Komplexassemblierung nicht dafür zu sorgen, dass das daraus gewonnene Eluat eine D-Box-abhängige stimulierende Komponente enthält, die etwa im Eluat vom mutierten 5S-Fragment nicht enthalten wäre; auch ist dieses Eluat per se nicht transkriptionsaktiver. Ein weiteres interessantes Ergebnis ist, dass der Unterschied in der Transkription zwischen Wildtyp-Gen und mutiertem Gen geringer wird, wenn TFIIIC1 gemeinsam mit den Eluaten in der Transkription eingesetzt wird.

3.2.7. Das Ausmaß der unterschiedlichen Transkriptionseffizienz zwischen D-Box-mutiertem und Wildtyp-5S-Gen ist abhängig von der TFIIIC1-Konzentration und von den Inkubationsbedingungen

Aus dem vorangegangenen Experiment ist ersichtlich, dass die Zugabe von TFIIIC1 zu Transkriptionsansätzen, welche mit Transkriptionskomplexeluaten erstellt wurden, die Transkription stark stimulierten. Dies war ebenso der Fall an VAI-Transkriptionskomplexen, die über Glyzeringradientenzentrifugation isoliert wurden (siehe 3.1.11., Abb. 18). Interessanterweise wurde die Transkription am mutierten 5S-Gen deutlich mehr stimuliert als am Wildtyp. Daher wurden weitere Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Effekt der D-Box-Mutation auf die Transkriptionseffizienz von der TFIIIC1-Konzentration im Transkriptionsansatz abhängt.

Als Grundlage diente ein vollständig rekonstituiertes Transkriptionssystem, bestehend aus TFIIIB β , Pol III, TFIIIC2 und TFIIIA. Zu diesem System wurde eine

MQ-TFIIC1-Fraktion titriert. In Abb. 24A ist die Transkription gezeigt und in Abb. 24B und C die quantitative Auswertung.

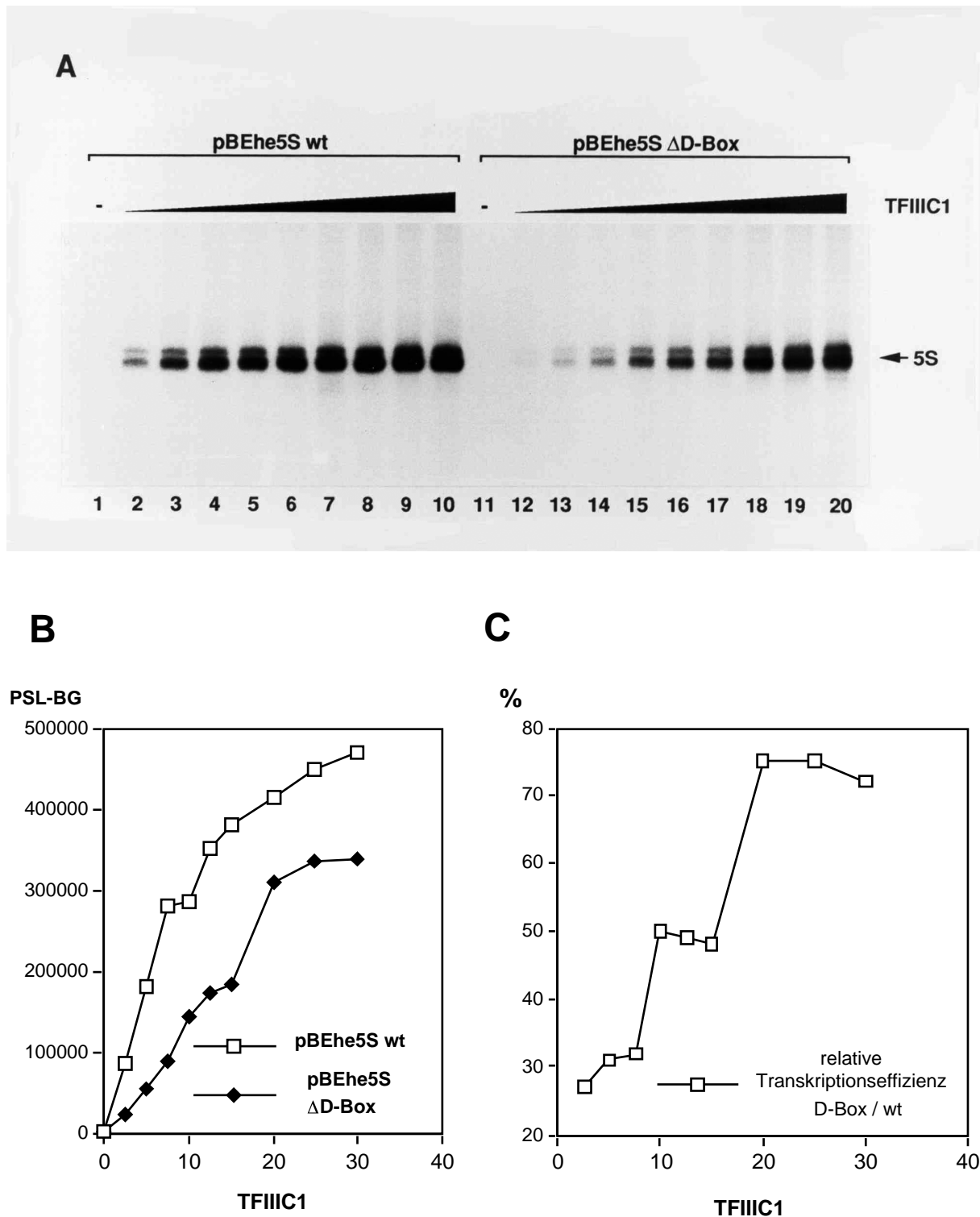


Abb. 24: *In vitro* Transkription. TFIIC1-Titration an pBEhe5S wt und pBEhe5S ΔD-Box

Je 1 µg der Plasmide pBEhe5S wt bzw. ΔD-Box wurden mit 2 µl TFIIBβ, 2 µl Polymerase III, 2,5 µl TFIIC2 und 7,5 µl TFIIC1A (PCAD) transkribiert. Die TFIIC1-Menge wurde titriert.

A: Bahnen 1 bis 10: Transkription an pBEhe5S wt mit 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25 und 30 μ l TFIIC1, Bahnen 11- 20: Transkription an pBEhe5S D-Box mit 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25 und 30 μ l TFIIC1.

B: graphische Darstellung der quantitativen Auswertung der Transkription in PSL-BG.

C: graphische Darstellung der quantitativen Auswertung, Verhältnis der Transkriptionseffizienz pBEhe5S wt/ D-Box in %.

Die Transkriptionseffizienz an beiden Konstrukten war stark abhängig von der TFIIC1 Konzentration. Ohne TFIIC1 war an keinem der beiden Genkonstrukte pB5S wt bzw. D-Box eine Transkription nachzuweisen (Abb. 24A, Bahnen 1 und 11). Die Signalstärke war bei Zugabe von TFIIC1 hochgradig abhängig von der eingesetzten Menge. Über den gesamten getesteten Bereich führten höhere TFIIC1 Mengen zu einer weiter ansteigenden Transkription, unabhängig davon, welches Plasmid eingesetzt wurde (siehe Bahnen 2 bis 10 für wt, Bahnen 12-20 für D-Box, siehe auch Abb. 24B). Allerdings zeigte sich für beide Konstrukte eine kleine Schulter, der aber für das wt-Plasmid bereits bei etwas niedrigeren TFIIC1-Mengen auftrat als an der Mutante (siehe Abb. 24B). Die Entstehung dieser Schulter wurde nicht weitergehend untersucht.

Über den gesamten Bereich der TFIIC1-Konzentration war die Transkription am Wildtyp stärker als an der Mutante. Allerdings veränderte sich das relative Verhältnis zueinander signifikant (Abb. 25C). Während bei geringen TFIIC1-Konzentrationen (2,5, 5 und 7,5 μ l) die Wildtyp-DNA etwa dreimal so stark transkribiert wurde wie die Mutante, schrumpfte der Unterschied im mittleren Bereich auf ca. das Doppelte (10, 12 und 15 μ l). Bei hohen TFIIC1-Konzentrationen konnte die D-Box-Mutante sogar auf dreiviertel der Transkriptionsaktivität des Wildtyp-Gens aufholen (siehe Abb. 24C).

Kontrollexperimente mit variierenden TFIIB β - und TFIIA-Konzentrationen zeigten, dass das Ausmaß der unterschiedlichen Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und Mutante in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge zwar etwas schwankte, aber keine signifikante Korrelation aufwies (Daten nicht gezeigt). Somit ist festzustellen, dass hohe TFIIC1-Konzentrationen die Transkriptionsaktivität am mutierten Gen in soweit begünstigen, dass sie im Vergleich zum Wildtyp-Gen partiell aufholt.

Unklar ist aber, welcher Mechanismus Grundlage für die TFIIC1-abhängige unterschiedliche Transkriptionseffizienz an Wildtyp- und D-Box-mutierten 5S-Gen ist.

Da bereits assemblierte VAI-Transkriptionskomplexe, die über Glyzeringradienten isoliert wurden, durch TFIIIC1 stimuliert werden können (Abb. 18), ist es denkbar, dass diese TFIIIC1-abhängige Stimulation auf eine Erhöhung der Reinitiationsrate der Transkriptionskomplexe zurückzuführen ist.

Daher sollte nun überprüft werden, ob die beobachtete Abhängigkeit der unterschiedlichen Transkriptionsrate an 5S-Wildtyp und 5S-Mutante nur bei einer normal zyklisch ablaufenden Transkription zu detektieren ist, oder ob dies auch unter „Single Round“-Bedingungen der Fall ist.

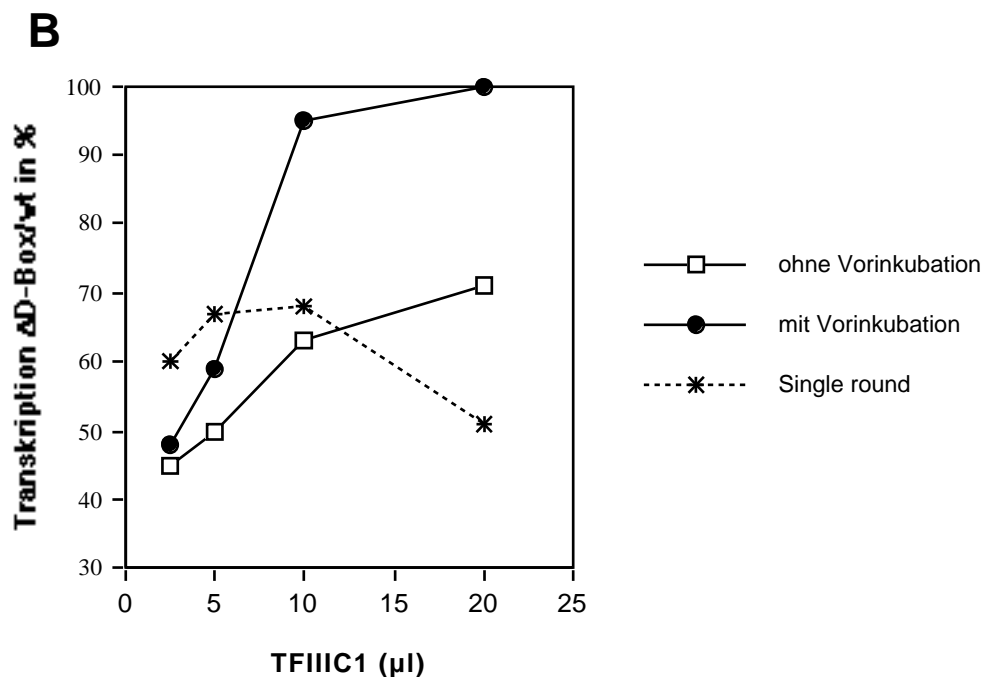
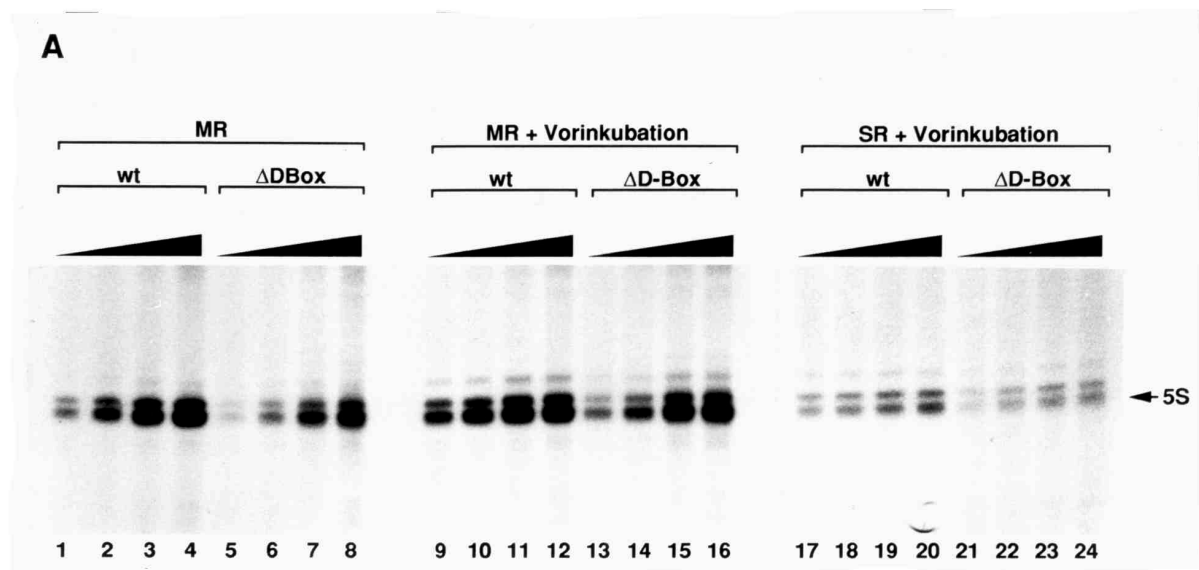


Abb. 25: *In vitro* Transkription. Veränderung der Transkriptionseffizienz am Wildtyp- und Δ D-Box-5S-Gen unter variierten Inkubationsbedingungen.

Ein rekonstituiertes Transkriptionssystem, bestehend aus 2,5 μ l TFIIB β , 2 μ l Polymerase III, 2,5 μ l TFIIC2 und 7,5 μ l TFIIA (PCAD) wurde mit vier verschiedenen Mengen TFIIC1 unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen transkribiert.

A: Bahnen 1-8: 90 min Inkubation mit 3 μ Ci ($^{-32}$ P)GTP ohne Vorinkubation („Multiple Round ohne Vorinkubation“), Bahnen 9-16: Vorinkubation der DNA mit den Proteinen für 45 min, nach Zugabe von Nukleotiden und 10 μ Ci ($^{-32}$ P)GTP Nachinkubation für 20 Minuten („Multiple Round mit Vorinkubation“), Bahnen 17-24: 45 min Vorinkubation plus 20 Minuten Nachinkubation mit 10 μ Ci ($^{-32}$ P)GTP und 300 μ g/ml Heparin („Single Round mit Vorinkubation“). Die Bahnen 1 bis 16 wurden ca 14 Stunden autoradiographiert, die Expositionsdauer der Bahnen 17-24 betrug hingegen fünf Tage.

Bahnen 1, 5, 9, 13, 17 und 21: 2,5 μ l TFIIC1, Bahnen 2, 6, 10, 14, 18 und 22: 5 μ l TFIIC1, Bahnen 3, 7, 11, 15, 19 und 23: 10 μ l TFIIC1, Bahnen 4, 8, 12, 16, 20 und 24: 2,5 μ l TFIIC1. Bahnen 1-4, 9-12 und 17-20: pBEhe5S wt, Bahnen 5-8, 13-16 und 21-24: pBEhe5S Δ D-Box.

B: graphische Darstellung der quantitativen Auswertung, Verhältnis der Transkriptionseffizienz pBEhe5S wt/ Δ D-Box in %.

Transkriptionsansätze wurden an pBEhe5S wt / Δ D-Box erstellt, wobei entweder eine „Standard“- *in vitro* Transkription durchgeführt wurde (Bahnen 1 bis 8), oder es wurde zunächst die DNA mit den Proteinfractionen vorinkubiert (Bahnen 9-24). Danach wurden die so assemblierten Transkriptionskomplexe entweder unter „Multiple Round“-Bedingungen (Bahnen 9- 16) oder unter „Single Round“-Bedingungen (Bahnen 17 bis 24) transkribiert. Vier verschiedene Mengen TFIIC1 wurden jeweils am Wildtyp und am mutierten 5S-Gen getestet.

Unter normalen „Multiple Round“-Bedingungen zeigte sich erneut, dass das Ausmaß der unterschiedlichen Transkriptionsrate an 5S-Wildtyp und 5S-Mutante mit steigender Menge TFIIC1 geringer wird. Mit 2,5 μ l TFIIC1 zeigte die Mutante ca. 45% Transkriptionsaktivität des Wildtyp-Gens (vgl. Bahne 1 mit 5), während dieser Wert bei 20 μ l bereits 71 % betrug (vgl. Bahnen 4 mit 8).

Wurde die Vorinkubationsperiode vor die „Multiple Round“-Transkription vorgeschaltet, war diese Tendenz ebenso deutlich zu erkennen. Allerdings war der Unterschied per se signifikant geringer. So wurde die Mutante mit 2,5 μ l TFIIC1 bereits mit 48% Effizienz des Wildtyps transkribiert (vgl. Bahnen 9 mit 13). Bei 10 μ l TFIIC1 war die Mutante dem Wildtyp bereits auf 95% angenähert, bei 20 μ l wurden beide Matrizen gleich stark transkribiert (vgl. Bahnen 11 und 12 mit 15 und 16).

Die „Single Round“-Transkription der Ansätze ergab, dass bei allen TFIIIC1-Konzentrationen die Wildtyp-DNA signifikant stärker transkribiert wurde als die Mutante (vergleiche Bahnen 17 bis 20 mit 21 bis 24), was darauf hindeutet, dass während der Vorinkubationsphase an der D-Box-Mutante weniger funktionelle Transkriptionskomplexe ausgebildet wurden als am wt-5S-Gen.

Es zeigte sich also erneut, dass eine hohe TFIIIC1-Konzentration die Wirkung der D-Box-Mutation partiell kompensieren kann. Allerdings deuten die Ergebnisse dieses Experiments darauf hin, dass die D-Box-Mutation nicht nur eine verringerte Reinitiationsrate hervorruft, sondern dass auch die Assemblierungsphase des Transkriptionskomplexes negativ beeinflusst wird.

4. Diskussion

Der Transkription durch die RNA-Polymerase III kommt eine Sonderstellung unter den drei RNA-Polymerase-Systemen in der eukaryonten Zelle zu. Die Pol III Gene kodieren für RNAs, die deutlich kleiner als 200 Nukleotide sind, während die Pol II Gene meist für RNAs von mehreren kB kodieren, und auch das 45S-rRNA-Gen der Polymerase I stellt eine vergleichsweise lange Einheit dar. Alle Pol III Gene der Hefe sowie die klassischen Gene im Menschen tragen ihre Promotorelemente innerhalb der kodierenden Region, was im Vergleich zu den anderen eukaryonten Genen eine Besonderheit ist. Außerdem unterscheidet sich der Mechanismus der Termination der RNA-Synthese im Pol III System signifikant von den anderen beiden Polymerase-Systemen und ähnelt eher der Situation in Bakterien. Eine konsekutive Folge von mindestens 4 Thyminresten im nicht-kodierenden Strang reicht aus, um die RNA-Synthese zu beenden und den ternären Komplex aufzulösen (Bogenhagen et al., 1980; Campbell und Setzer, 1992). Im Pol II System ist die Elongation und die Termination der RNA-Synthese hingegen eng mit der Prozessierung der entstehenden RNA gekoppelt. In diesem Zusammenhang sind eine ganze Reihe von Enzymen direkt oder indirekt an diesem Vorgang beteiligt (Proudfoot, 2000). Auch im Polymerase I System ist mit TTFI ein Transkriptionsfaktor bekannt, dessen Bindung an das Terminationssignal für die Auflösung des ternären Komplexes am Terminator essentiell ist (Grummt et al., 1986; Kuhn et al., 1990).

Eine der auffälligsten Eigenschaften des RNA-Polymerase III Systems ist, dass die Transkription ein in hohem Maße zyklisch ablaufender Prozess ist. Für das humane System wurde geschätzt, dass assemblierte Transkriptionskomplexe mehrere 100 Male in der Stunde reinitiiert werden können (Kovelman und Roeder, 1990). Untersuchungen im Hefe-System ergaben, dass eine RNA-Polymerase, die den Terminator erreicht, nicht vollständig aus dem Transkriptionskomplex entlassen, sondern an den Initiator desselben Komplexes zurückgeführt wird. Diese erleichterte Reinitiation („facilitated recycling pathway“) der Polymerase sorgt für die äußerst hohe Reinitiationsrate des Transkriptionskomplexes. Das Vorhandensein des Terminators ist in der Hefe eine essentielle Voraussetzung für diesen Mechanismus (Dieci und Sentenac, 1996). Auch im humanen Transkriptionssystem wird der Terminator für eine effiziente Transkription benötigt (Wang und Roeder, 1996). Dies

lässt vermuten, dass dem Terminator auch hier eine wichtige Rolle bei der Reinitiation der Transkription zukommt.

Völlig unklar ist bisher noch, welche der Transkriptionsfaktoren bei der Reinitiation mitwirken. Während in der Hefe gezeigt wurde, dass *in vitro* TFIIB für die wiederholte Rekrutierung der Polymerase in den Transkriptionskomplex alleine ausreicht (Kassavetis et al., 1990), werden im humanen System mehrere weitere Transkriptionsfaktoren als mögliche Interaktionspartner der Polymerase diskutiert (siehe 1.5.2.).

Neben den basalen Transkriptionsfaktoren wurde auch eine essentielle Beteiligung des Autoantigens La an der Durchführung des Transkriptionszyklus vermutet. Zu Beginn des Zeitraums dieser Doktorarbeit ließen die vorliegenden Publikationen erwarten, dass La an der Freisetzung der RNA aus dem ternären Komplex beteiligt ist und daher möglicherweise als Terminationsfaktor agiert (Gottlieb und Steitz, 1989a; Gottlieb und Steitz, 1989b; Maraia et al., 1994). Über diese Funktion hinaus wurde postuliert, dass La auch für die Dissoziation der Polymerase am Terminator und für ihre erneute Rekrutierung an den Initiator verantwortlich sein soll (Maraia et al., 1994; Maraia, 1996; Goodier und Maraia, 1998). Es bestanden aber Zweifel an diesem Modell, da z.B. alle diese Ergebnisse durch Experimente mit groben Zellextrakten erzielt wurden. Eine essentielle Rolle von La in einem La-defizienten Rekonstitutionssystem konnte hingegen nicht gezeigt werden.

Obwohl bei den genintern regulierten Pol III Genen das Vorhandensein der internen Kontrollelemente, des Initiators und des Terminators für eine effektive Transkription ausreicht, wurden für eine Reihe von Genen auch modulierende Einflüsse der 5'-flankierenden Bereiche auf die Transkriptionsrate diskutiert. Am humanen 5S-Gen konnte eine Sequenz lokalisiert werden, deren partielle Deletion zu einer drastischen Verringerung der Transkriptionsrate führte. Diese als D-Box bezeichnete Sequenz liegt außerhalb der kodierenden Region im 5S-Gen (Nielsen et al., 1993). Bisher konnte nicht geklärt werden, welche Funktion die D-Box im Transkriptionszyklus ausübt. Auch konnte bisher kein Protein isoliert werden, das eine spezifische Interaktion mit diesem Element eingeht.

Zielsetzung dieser Arbeit war es, Informationen über den Ablauf der verschiedenen Phasen des Transkriptionszyklus und über die daran beteiligten Transkriptionsfaktoren zu erzielen. Die Assemblierungsphase des Transkriptionskomplexes sollte von der Elongationsphase experimentell getrennt

werden. Außerdem wurde versucht, aus gereinigten Transkriptionsfaktoren assemblierte Transkriptionskomplexe von nicht inkorporierten Proteinen abzutrennen und so Analysen dieser isolierten Komplexe zu ermöglichen. Diese Versuchssysteme sollten dann u.a. weitere Informationen über die mögliche Funktion des La-Proteins im humanen Transkriptionssystem erbringen. Außerdem wurde begonnen, die funktionelle Rolle des bisher noch wenig erforschten Transkriptionsfaktors IIC1 im Transkriptionszyklus zu bestimmen. Als weiteres Projekt wurde versucht, die stimulierende Funktion der D-Box des humanen 5S-Gens funktionell zu analysieren und einen möglichen D-Box-abhängigen stimulierenden Faktor nachzuweisen.

4.1. Getrennte Analyse der Präinitiationskomplexbildung und der späteren Phasen der Pol III Transkription

Da die Pol III Transkription ein in hohem Maße zyklisch ablaufender Prozess ist, ist es nicht einfach, funktionelle und strukturelle Analysen des Transkriptionskomplexes auf eine Phase des Zyklus zu begrenzen. Einige Transkriptionsfaktoren könnten z.B. während einzelner Abschnitte des Zyklus ganz unterschiedliche Aufgaben ausüben. Andere könnten hingegen ganz spezifisch nur an einem Vorgang, z.B. an der Assemblierung des Komplexes, beteiligt sein. Um in den weiteren (und zukünftigen) Untersuchungen solche Funktionen der Faktoren differenzierter analysieren zu können, wurden neue Untersuchungssysteme etabliert. Zunächst wurde überprüft, ob es möglich ist, Transkriptionskomplexe *in vitro* zu assemblieren und dann die RNA-Synthese kurz nach der Initiation zu arretieren. Im Falle des VAI-Gens sollte dies bei fehlendem exogenen UTP nach sechs Nukleotiden erfolgen. Anfängliche Experimente zeigten, dass eine Arretierung bei Einsatz von zytoplasmatischem Extrakt nicht möglich ist, da in solch groben Extrakten eine zu hohe Konzentration endogener Nukleotide enthalten ist. Auch ohne Zugabe von unmarkierten exogenen Nukleotiden konnte bei Anwesenheit von ($-^{32}\text{P}$)GTP eine Transkription erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse aus Abb. 1 zeigen, dass die Konzentration des endogenen UTPs in der PCB und PCC bereits durch die Phosphocellulosechromatographie soweit abgesenkt wird, dass zumindest nach 15 Minuten keine Volle-Länge-Transkripte synthetisiert werden konnten. Erst der Einsatz eines vollständig rekonstituierten Systems konnte aber völlig sicherstellen, dass es zu keinem Durchlesen der Polymerase über Nukleotid 6 hinauskommt. Das

leichte Durchlesen, das in Abb. 2 und 3 zu detektieren ist, ist dementsprechend auf die Verwendung einer PCC-Fraktion (zusammen mit einer TFIIB β -Fraktion) in diesen Experimenten zurückzuführen.

Auch die GTP- und CTP-Konzentrationen waren im rekonstituierten System so gering, dass ohne exogene Zugabe dieser Nukleotide kein Volle-Länge-Transkript erzielt werden konnte. Hingegen war ATP trotz der Reinigung immer noch in signifikanten Mengen enthalten (Daten nicht gezeigt). Durch Weglassen der Nukleotide während der Vorinkubation können deshalb bei Einsatz eines rekonstituierten Systems am VAI- und am 5S-Gen auch Transkriptionskomplexe assembliert werden, die die erste Phosphodiesterbindung (G-G am VAI-Gen und G-U am 5S-Gen) noch nicht geknüpft haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin untersucht, welche Zeiträume für die Assemblierung des Transkriptionskomplexes und für die Elongationsphase am VAI-Gen benötigt wird. Bei 30°C waren am VAI-Gen nach 15 Minuten alle Komplexe assembliert, initiiert und aufgrund des fehlenden UTPs nach Nukleotid 6 arretiert (Abb. 2). Alle diese arretierten Komplexe waren nach Zugabe von UTP weiterhin elongationskompetent und konnten fast alle ihre RNA in Volle-Länge-Transkripte erweitern. Auf dem Weg dorthin konnten etliche „Pausing Sites“ detektiert werden (Abb. 2 und 3), wie sie für die Pol III Transkription der Hefe und auch für andere RNA-Polymerasen beschrieben wurden. Die Geschwindigkeit der RNA-Synthese und die Dauer der „Pausing Sites“ ist abhängig von der Nukleotidkonzentration (Matsuzaki et al., 1994). Deutlich ersichtlich wird, dass bei 1,2 mM GTP (Abb. 3) während der Elongationsphase die Synthese deutlich schneller erfolgt als bei 10 μ M (Abb. 2). Interessanterweise konnten aber auch bei nicht-limitierender Nukleotidkonzentration einige Pausierungsstellen detektiert werden. Daher ist anzunehmen, dass auch im humanen Pol III System am VAI-Gen Pausierungen während der Elongationsphase auftreten, die nicht auf bloßen Nukleotidmangel zurückzuführen sind. Ob diese Pausierungen auf intrinsische Arrestsignale der DNA oder auf im Weg liegende Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist, kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht entschieden werden. Allerdings ist es denkbar, dass die Pausierungen * und ** in Abb. 3 möglicherweise auf ein Zusammentreffen der Polymerase mit einem der Transkriptionsfaktoren zurückzuführen ist. In der Hefe wurde gezeigt, dass durch Heparin TFIIA und der -Komplex von der DNA „gestrippt“ werden können, während TFIIB fest assembliert bleibt (Kassavetis et al.,

1990). Ähnliches konnte nie für das humane System gezeigt werden, aber es ist auffällig, dass die Pausierungen * und ** nur auftraten, wenn kein Heparin während der Elongationsphase anwesend war. Das unterschiedlich ausgeprägte Pausieren beeinflusste in der Tat die Geschwindigkeit der RNA-Synthese. Unter Heparineinfluss benötigten die Polymerasen ca. 15 Sekunden, um den Terminator zu erreichen, während dies aufgrund der zusätzlichen Pausierungen ohne Heparin erst nach 20 bis 30 Sekunden der Fall war. Somit ist deutlich, dass die Elongationsphase verglichen mit der Phase der Komplexassemblierung ein weitaus schnellerer Vorgang ist, was die ebenfalls im humanen System erhobenen Daten von Bieker et al. (1985) und Kovelman und Roeder (1990) bestätigt.

Aber nicht nur die Elongation, sondern auch die Reinitiation ist ein schnell ablaufender Prozess. Abb. 1 zeigt, dass nach Zugabe von UTP innerhalb von fünf Minuten (bei 30°C) eine große Menge RNA synthetisiert wurde, die deutlich über „Single-Round“-Niveau lag. In diesem Zeitraum müssen also etliche Transkriptionszyklen abgelaufen sein.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft, ob die RNA-Polymerase während der zyklischen Reinitiation demselben Transkriptionskomplex treu bleibt, wie dies für die Hefe gezeigt worden ist. Es spricht aber einiges dafür, dass das von Dieci und Sentenac (1996) aufgestellte Modell der „erleichterten Reinitiation“ auch für das humane Pol III Transkriptionssystem seine Gültigkeit hat. Auch hier ist eine extrem schnell ablaufende Reinitiation vorzufinden, und die Transkription ist in hohem Maße abhängig vom Terminator.

4.2. Isolierung und Charakterisierung humaner Transkriptionskomplexe

Im humanen Transkriptionssystem besteht noch immer eine weitreichende Unklarheit darüber, welche Funktionen die einzelnen Transkriptionsfaktoren bzw. ihre Untereinheiten im Transkriptionskomplex ausüben. Beispielsweise ist über die Funktion und die Art der Einbindung von TFIIC1 in den Transkriptionskomplex nur sehr wenig bekannt (siehe 4.4). Dass La ein Bestandteil des humanen Transkriptionskomplexes ist, wurde zwar aufgrund von funktionellen Daten postuliert, konnte aber nie in einer Western Blot-Analyse gezeigt werden. Und auch über das Schicksal der anderen Transkriptionsfaktoren während des Transkriptionszyklus gibt es bisher keine Daten. Selbst für die Hefe ist hierüber nur wenig bekannt. Ob sich

z.B. die „Assembly Faktoren“ yTFIIIA und yTFIIIC auch ohne Heparineinfluss tatsächlich von der DNA ablösen, nachdem die Polymerase die RNA-Synthese initiiert hat, ist nicht geklärt.

Eine mögliche Herangehensweise an die Klärung solcher offener Fragen war, Transkriptionskomplexe aufgrund ihrer enormen Größe von nicht inkorporierten Transkriptionsfaktoren zu isolieren und anschließend funktionell und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu charakterisieren. Transkriptionskomplexe wurden daher an Plasmid-DNA assembliert und nach der Initiation arretiert (4.1.). Diese aus gereinigten Faktoren generierten Komplexe wurden dann auf Glyzeringradienten aufgetragen und zentrifugiert. Sie erwiesen sich dabei als ähnlich stabil wie die aus Zellextrakten assemblierten Transkriptionskomplexe von Wingender et al. (1984) und Jahn et al. (1987) und sedimentierten in den zentralen Fraktionen des Gradienten. Sie erwiesen sich als transkriptionsaktiv (Abb. 9) für multiple Zyklen der Transkription (Abb. 16). Neben dem funktionellen Nachweis in der *in vitro* Transkription wurden die isolierten Transkriptionskomplexe auf ihre Spezifität und ihre Zusammensetzung im Western Blot analysiert.

Zunächst wurde überprüft, welches Sedimentationsverhalten die zu untersuchenden Faktoren in den Gradienten zeigten, wenn die Proteinfractionen des rekonstituierten Systems ohne DNA zentrifugiert wurden. Es zeigte sich, dass TFIIB β , La und die Polymerase nur unwesentlich in den Gradienten einlaufen konnten (Abb. 11 und Daten nicht gezeigt).

Da die meisten Transkriptionsfaktoren direkte Interaktionen mit DNA eingehen können, musste ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Transkriptionsaktivität in den zentralen Fraktionen der Glyzeringradienten nur auf eine mehr oder weniger unspezifische Assoziation der Faktoren an die Plasmid-DNA zurückzuführen ist. Wurden die Auftragsfraktionen vor der Zentrifugation ohne TFIIC2, dem primär DNA-bindenden Transkriptionsfaktor am VAI-Gen, inkubiert, konnte auch dann keine Transkriptionsaktivität in den Gradientenfraktionen detektiert werden, wenn nach der Zentrifugation TFIIC2 hinzugegeben wurde (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass in den vollständigen Glyzeringradienten funktionelle Transkriptionskomplexe isoliert wurden. Allerdings ist eine unspezifische Assoziation von TBP (TFIIB β) mit der Plasmid-DNA nachweisbar, die, wie bereits erwähnt, vermutlich auf kryptische TATA-Boxen auf der Vektor-DNA zurückzuführen

ist. Diese TBP-Fraktion war aber deutlich zu trennen von TBP, das in den Transkriptionskomplex integriert war, da letzteres weiter distal sedimentierte (Abb. 13). Der unspezifische TFIIB β -DNA Komplex erhöht das Molekulargewicht verglichen mit der freien DNA offenbar nur geringfügig, während der Transkriptionskomplex an der Plasmid-DNA ein wesentlich größeres Gebilde darstellt. Entsprechend war nur dann eine signifikante Verschiebung der Sedimentation der DNA in die distalen Fraktionen zu detektieren, wenn alle Faktoren präsent waren und somit aktive Transkriptionskomplexe ausgebildet wurden (Abb. 14).

TFIIB β konnte daher als integraler Bestandteil des humanen Pol III Transkriptionskomplexes nachgewiesen werden. Da angenommen wird, dass TFIIB β der Hauptinitiationsfaktor der humanen Pol III Transkription ist, und somit die Rekrutierung der Polymerase an den Initiator die (hauptsächliche) Aufgabe dieses Transkriptionsfaktors sein dürfte, ist zu vermuten, dass er, ähnlich wie γ TFIIB einen sehr festen Komplex mit der DNA ausbilden sollte. Aus Abb. 15 wird ersichtlich, dass TBP (TFIIB β) Bestandteil des Komplexes ist, unabhängig davon, ob die Transkriptionskomplexe zum Zeitpunkt der Isolierung noch nicht initiiert waren, nach sechs Nukleotiden arretiert vorlagen oder bereits zyklisch transkribierten. Die TBP-Verteilung unterschied sich zwischen diesen Gradienten nicht. Diese Beobachtung spricht dafür, dass auch im humanen System TFIIB β während des Transkriptionszyklus dauerhaft fest an der DNA gebunden bleibt.

La ist offenbar zu keinem Zeitpunkt der Transkription mit dem Komplex assembliert, wie in Abschnitt 4.3. näher ausgeführt wird. Was passiert aber mit den anderen Transkriptionsfaktoren? Da weder Antikörper gegen TFIIC2 noch gegen TFIIC1 zur Verfügung standen, konnte diese Frage noch nicht hinreichend geklärt werden (siehe auch 4.4.). Es konnte zwar kein unterschiedliches Sedimentationsverhalten zwischen zyklisch transkribierenden und noch nicht initiierten Komplexen festgestellt werden. Ob aber der Verlust einer der Transkriptionsfaktoren während der Elongation oder anderer Phasen des Zyklus einen signifikanten Laufunterschied der Komplexe hervorrufen würde, ist in Anbetracht der Größe des Gesamtkomplexes eher unwahrscheinlich.

Inzwischen konnten auch am 5S- und am U6-Gen aus gereinigten bzw. teilgereinigten Transkriptionsfaktoren assemblierte Transkriptionskomplexe über Glyzeringradienten isoliert werden (Daten nicht gezeigt; pers. Mitteilung: Christin

Gruber). Im letzteren Fall konnte auch bereits damit begonnen werden, die Beteiligung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren im Transkriptionskomplex der 5'-regulierten Gene durch Western Blot-Analysen nachzuweisen.

4.3. Ist La ein Pol III Transkriptionsfaktor?

Zu Beginn der vorliegenden Untersuchung wurde aufgrund publizierter Daten davon ausgegangen, dass La ein Terminationsfaktor (und ein Reinitiationsfaktor) des Pol III Transkriptionssystems ist. Die vorhandenen Daten basierten auf Transkriptionsexperimenten mit groben Zellextrakten, und diese wurden, abgesehen von den anfänglichen Untersuchungen von Gottlieb und Steitz, ohne Ausnahme an immobilisierten Matrizen durchgeführt.

In unserem Labor zeigten sich hingegen auch rekonstituierte Transkriptionssysteme aus gereinigten Transkriptionsfaktoren ohne exogenes La transkriptionsaktiv. Es wurde allerdings zuvor nie überprüft, ob die verwendeten Transkriptionssysteme La enthielten. Deshalb sollte überprüft werden, ob unsere rekonstituierten Transkriptionssysteme signifikante Mengen an La und somit den benötigten Terminationsfaktor beinhalten. Überraschenderweise enthielten nicht nur alle vier Phosphocellulosefraktionen größere Mengen an La. Auch in Fraktionen, die weiter gereinigte Transkriptionsfaktoren enthielten, war mehr oder weniger La nachweisbar. (Abb. 4). Dieser Befund wies auf ein sehr unterschiedliches chromatographisches Verhalten verschiedener Subpopulationen von La hin.

Da besonders viel La im C0-Bereich des CMQ-Gradienten eluierte, wurde überprüft, ob diese La-Subpopulation entweder identisch mit der „Terminationsregion bindenden Aktivität“ (TBA) sein könnte oder mit dieser komplexiert vorliegt. Allerdings konnte La durch einen Kationentauscher von dem weiterhin bindungsaktiven TBA getrennt werden (Daten nicht gezeigt). Daher ist nicht davon auszugehen, dass TBA und La etwas miteinander zu tun haben.

Da also Transkriptionssysteme mit weitgehend gereinigten Transkriptionsfaktoren La enthielten, schien es zunächst denkbar, dass dies der Grund dafür war, dass solche Systeme ohne La-Zugabe transkriptionsaktiv waren. Da La mit 50 kDa ein eher kleines Protein ist, die humanen Transkriptionsfaktoren der klassischen Gene mit Ausnahme von TFIIIA hingegen größere Proteinkomplexe darstellen, lag die Idee nahe, La durch Größenselektion von den Transkriptionsfaktoren abzutrennen.

Überraschenderweise zeigten aber Gelfiltrationen der PCB und PCC, dass zumindest die in diesen Fraktionen enthaltenen Subpopulationen von La offenbar als größere Komplexe vorliegen (Abb. 5).

Obwohl die Reinigung der Transkriptionsfaktoren über klassische Chromatographie eine vollständige Abtrennung von La aus den Fraktionen nicht erbringen konnte, betrug die La-Konzentration des verwendeten rekonstituierten Transkriptionssystem im Vergleich zum S100-Transkriptionssystem weniger als 5 % (Abb. 4C). Ein quantitativer Vergleich im Western Blot mit rekombinantem La ergab, dass in einer Probe dieses Transkriptionssystems ca. 10 ng La enthalten waren (Daten nicht gezeigt). Dieser Wert wird auch durch den funktionellen Vergleich der RNA-Immunopräzipitation durch rekombinantes und endogenes La in Abb. 8 bestätigt.

Das verbleibende La konnte schließlich mittels der in Abb. 6 präsentierten Immunodepletion mit monoklonalen Antikörpern gegen La vollständig aus dem Transkriptionssystem entfernt werden. Erstaunlicherweise war aber dieses La-depletierte Transkriptionssystem nicht weniger transkriptionsaktiv als das scheindepletierte Kontrollsystem. Eine quantitative Abschätzung des Detektionsminimums des Western Blots ergab, dass pro Transkriptionsprobe maximal 0,25 ng La enthalten sein konnten. Diese Menge liegt aber weit unter den Erfahrungswerten für den Bedarf anderer rekombinanter Transkriptionsfaktoren vergleichbarer Größe. So werden zum Beispiel für eine effiziente U6- oder 7SK-Transkription 10-50 ng rekombinantes TBP benötigt (Teichmann, 1995; pers. Mitteilungen: Wolfgang Meissner und Zhengxin Wang).

Dass La nach der Transkription mit der neusynthetisierten Pol III RNA komplexiert vorliegt, ist unstrittig. Allerdings konnten bereits 1982 Daten von Francoeur und Mathews präsentiert werden, die Anhaltspunkte dafür lieferten, dass die La-RNA-Komplexierung zwar mit der gleichen Kinetik abläuft wie die RNA-Synthese, aber nicht funktionell mit ihr verknüpft ist, und somit die RNA-Synthese auch unabhängig von der La-Komplexierung erfolgen kann. Demgegenüber stehen die Daten von Gottlieb und Steitz (1989), welche nahelegten, dass ein La-depletierter zytoplasmatischer Extrakt seine Transkriptionsaktivität verliert. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Bindung von La an das 3'-Ende der RNA essentiell sein soll für ihre Freisetzung aus dem ternären Komplex am Terminator.

Neuere Untersuchungen im *Xenopus*-System zeigten aber, dass die *in vitro* Transkription mit einem La-depletierten zytoplasmatischen Extrakt (S100) zwar zu

einem veränderten Prozessierungsmuster der synthetisierten tRNA führte, die Neusynthese der RNA aber nicht beeinflusst war. Koimmunopräzipitationen von tRNA mit Antikörpern gegen *X.l.*La zeigten bei Verwendung des immunodepletierten Extraktes eine massive Herabsetzung der La-tRNA-Komplexbildung, was vermutlich der Grund für die veränderte RNA-Prozessierung darstellte. Allerdings konnten in diesen Experimenten 1 bis 3% des im S100 enthaltenen Las trotz wiederholter Depletion nicht entfernt werden, sodass eine gewisse Menge La im Transkriptionssystem verblieb (Lin-Marq und Clarkson, 1998).

Fraglich ist allerdings, ob diese Ergebnisse aus *X. laevis* direkt auf das humane System übertragbar sind. Da RNA-Bindung und Termination der Transkription offenbar zeitlich und räumlich benachbarte Prozesse sind (Francoeur und Mathews, 1982), ist die Entwicklung einer zusätzlichen Funktion von La als Transkriptionsfaktor bei der Entwicklung von den Amphibien zu den Säugetieren zunächst nicht auszuschließen. Das in dieser Arbeit immunodepletierte rekonstituierte Transkriptionssystem lag in seiner La-Konzentration aber vermutlich weit unter der anzunehmenden Konzentration des depletierten S100 von Lin-Marq und Clarkson, und da es ebenso keine Transkriptionseinbuße zeigte, ist eine solche evolutionäre Weiterentwicklung von La unwahrscheinlich. Trotzdem war es nötig zu überprüfen, ob das immunodepletierte System noch in der Lage war, RNPs mit der synthetisierten RNA auszubilden. Dass dies aber nicht der Fall war, zeigen Abb. 7 und 8. Während das scheindepletierte Transkriptionssystem eine signifikante Menge an La-RNPs bildete, konnten bei Verwendung des La-depletierten Systems keine RNPs detektiert werden. Dass aber eine quantitative Korrelation zwischen RNP-Formation und La-Konzentration besteht, wird ebenfalls deutlich. Je mehr La in den Ansatz gegeben wurde, desto mehr RNPs konnten detektiert werden. Dieser Dosis-abhängigen RNP-Formationsrate steht aber keine La-abhängige Veränderung der RNA-Synthese gegenüber.

Diese Ergebnisse lassen für sich alleine keine Anhaltspunkte dafür erkennen, dass La für die Synthese von Pol III abhängiger RNA benötigt wird und stehen im krassen Widerspruch zu den Daten von Gottlieb und Steitz sowie von Maraia. Das erweiterte Modell von Maraia (Maraia, 1996) geht davon aus, dass La ein Transkriptionsfaktor des Pol III Systems ist, der neben seiner Funktion als Terminationsfaktor auch für die Rekrutierung der Polymerase in den Transkriptionskomplex benötigt wird und daher auch als Initiations- bzw. als Reinitiationsfaktor agiert. Durch Waschen mit Heparin

und höheren Salzkonzentrationen soll La aus dem Transkriptionskomplex herausgelöst werden können. Der Komplex soll dann transkriptionsinaktiv sein und erst wieder durch die Zugabe von La reaktiviert werden können (Maraia et al., 1994; Maraia, 1996; Fan et al., 1997). In keiner der betreffenden Arbeiten wurden diese Annahmen aber durch eine Western Blot-Analyse überprüft.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode der Isolierung von Transkriptionskomplexen über Glyzeringradienten machte es zum ersten Mal möglich, humane Pol III Transkriptionskomplexe auf ihre Bestandteile hin zu untersuchen. Während nachgewiesen werden konnte, dass TBP als Untereinheit von TFIIB Bestandteil des Transkriptionskomplexes ist (siehe 4.2.), konnte eine Assoziation von La mit dem Transkriptionskomplex ausgeschlossen werden. La zeigte keinerlei Kosedimentation mit der Transkriptionsaktivität, unabhängig davon, ob die Transkriptionskomplexe zum Zeitpunkt der Isolierung die RNA-Synthese noch nicht initiiert hatten, nach sechs Nukleotiden arretiert waren oder bereits zyklisch transkribierten (Abb. 12 und 15). Isolierte Transkriptionskomplexe aus Gradientenfraktionen, die nachweislich frei von La-Kontaminationen waren, zeigten sich transkriptionsaktiv und auch reinitiationsfähig (Abb. 16). Die Zugabe von exogenem La zeigte keinen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität dieser Komplexe (Abb. 17).

Interessant ist, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete Transkriptionssystem bereits mit weniger als 0,25 ng La voll transkriptionsaktiv war, während in den Arbeiten von Maraia und Mitarbeitern zwischen 250 und 1000 ng La eingesetzt werden mussten, um die „Transkriptionsaktivität“ der gewaschenen immobilisierten Komplexe wiederzuerlangen. Dieser Effekt konnte auch bei Zugabe von BSA in geringerem Ausmaß beobachtet werden (Maraia et al., 1994). Es ist daher durchaus möglich, dass in diesen Experimenten nicht die RNA-Synthese durch das Waschen zum Erliegen gekommen ist, sondern dass die fertige RNA mit dem Trägermaterial Interaktionen einging und dies durch Zugabe von La oder unspezifischem Protein verhindert werden konnte.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die vorliegenden Daten eindeutig gegen eine Beteiligung von La an der humanen Pol III Transkription sprechen. Ein vollständig La-depletiertes Transkriptionssystem zeigte volle Transkriptionseffizienz und erzeugte korrekt terminierte VAI- und 5S-RNA. Diese hierbei entstehende RNA ist anschließend nicht mit La in RNPs komplexiert. Zugabe von rekombinantem La kann zwar die RNP-Assemblierung wiederherstellen, dies führt aber zu keinerlei

Veränderung der Transkriptionsaktivität. Eine funktionelle Kopplung der Transkription und der RNP-Bildung ist daher *in vitro* als nicht gegeben anzunehmen, wie dies bereits für Hefe und *Xenopus* gezeigt werden konnte. Außerdem konnten keine Anhaltspunkte dafür gefunden werden, dass La dauerhaft oder vorübergehend mit dem humanen Pol III Transkriptionskomplex assembliert vorliegt.

Diese Daten können natürlich nicht ausschließen, dass es *in vivo* eine gewisse Verbindung zwischen Transkription und La-RNA-Komplexierung gibt. Dass allerdings La für die Auflösung des ternären Komplexes am Terminator essentiell ist und überdies benötigt wird für die Rekrutierung der Polymerase an den Initiator, ist mehr als unwahrscheinlich.

4.4. Die Rolle von TFIIIC1 und der anderen Transkriptionsfaktoren während der Komplexassemblierung und in späteren Phasen des Transkriptionszyklus

Von allen humanen Transkriptionsfaktoren des RNA-Polymerase III Systems ist über die Struktur und die Funktion von TFIIIC1 am wenigsten bekannt. Seine Größe wird mit etwa 200 kDa angenommen; es konnte aber bisher keine sichere Identifizierung der dazugehörigen Untereinheiten vorgenommen werden (siehe 1.4.).

Während ältere Daten darauf hindeuteten, dass TFIIIC1 den Footprint von TFIIIC2 über der B-Box bis zum Startpunkt der Transkription erweitert (Yoshinaga et al., 1987), zeigen neuere Daten, dass TFIIIC2 in höheren Konzentrationen alleine in der Lage ist, diesen Schutz zu erzielen (Oettel et al., 1997). In der Tat konnten einige Daten zeigen, dass TFIIIC1 stabilisierenden Einfluss auf die Bindung von TFIIIC2 bzw. der anderen primär DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren PBP und TFIIIA ausübt (Wang und Roeder, 1996; Oettel et al., 1997). Da TFIIIC1 aber essentiell für die Transkription aller Pol III Gene ist und auch in dem Pol III Transkriptionssystem des Enten-Histon-H5-Gens benötigt wird, in dem keiner der drei genannten Faktoren mitwirkt, ist diese Bindungsverstärkung mit Sicherheit nicht die einzige Funktion von TFIIIC1.

Inzwischen wurde die Komplexassemblierung des VAI-Transkriptionskomplexes im Detail untersucht. Obwohl diese Experimente noch nicht ganz abgeschlossen sind, deutet alles darauf hin, dass TFIIIC2 am VAI-Gen alleine nicht in der Lage ist, TFIIIB β fest in den Komplex zu verankern, sondern dass hierfür ebenfalls TFIIIC1

benötigt wird. Es ist daher davon auszugehen, dass TFIIIC1 nicht nur ein Polymerase-Rekrutierungsfaktor (Kober et al., 1998), sondern auch ein „Assembly“-Faktor nach der Definition von Kassavetis et al. (1990) ist (Hafner, 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TFIIIC1 isolierte Transkriptionskomplexe nachträglich stimulieren kann. Dies ist sowohl für VAI-Transkriptionskomplexe, welche über Glyzeringradienten isoliert worden sind, der Fall (Abb. 18), wie auch für 5S-Transkriptionskomplexe, die an immobilisierten Matrizen assembliert wurden (Abb. 23 und 25, siehe 4.7.).

Da nicht anzunehmen ist, dass die nachträgliche Gabe von TFIIIC1 den Aufbau von neuen Transkriptionskomplexen nach der Komplexisolierung ermöglichte, ist die TFIIIC1-bedingte Verstärkung der Transkriptionseffizienz möglicherweise auf eine Stimulierung der Reinitiationsrate zurückzuführen. Möglich ist, dass ein Teil der Transkriptionskomplexe während der Isolierung TFIIIC1 verloren hat, und dass diese Komplexe nachträglich reaktiviert werden konnten. Es ist also möglich, dass die Interaktion von TFIIIC1 mit dem Transkriptionskomplex nicht besonders stabil ist. Unterstützt wird eine solche Annahme durch die Beobachtung, dass Eluate von gewaschenen immobilisierten 5S-Transkriptionskomplexen durch TFIIIC1-Zugabe massiv in ihrer Transkriptionsaktivität stimuliert werden konnten. (siehe 4.7.). Möglich ist ferner, dass TFIIIC1 zwar für den Aufbau des Transkriptionskomplexes benötigt wird, selbst aber nicht, oder zumindest nicht dauerhaft, integriert wird. Da offensichtlich TFIIIC1 aber auch für die Rekrutierung der Polymerase in den Transkriptionskomplex benötigt wird, ist es möglich, dass TFIIIC1 für jede Reinitiationsrunde erneut mit dem Komplex in Kontakt tritt. Vielleicht ist dies der Grund dafür, dass hohe TFIIIC1-Konzentrationen in verschiedenen Testsystemen eine starke Transkriptionsaktivität zur Folge haben. So stimuliert z.B. die Zugabe von TFIIIC1 die Transkriptionsaktivität eines S100 (Haertel, 1999). Weitere Untersuchungen zur Wirkungsweise von TFIIIC1 sind zur Zeit im Gange. Ein Ziel ist es, Antikörper gegen TFIIIC1 zu synthetisieren, um z.B. zu überprüfen, ob TFIIIC1 dauerhaft mit dem Transkriptionskomplex assembliert ist.

TFIIIB β hingegen ist mit einiger Wahrscheinlichkeit dauerhaft in den Transkriptionskomplex integriert, wie die aus den isolierten Transkriptionskomplexen gewonnenen Daten zeigten (siehe 4.2.). Es konnte zwar auch durch die nachträgliche Zugabe von TFIIIB β zu den isolierten VAI-Transkriptionskomplexen

eine Stimulation der Transkription erzielt werden; diese war aber vergleichsweise gering (Abb. 18).

Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden, wie sich die anderen Transkriptionsfaktoren während der einzelnen Phasen des Transkriptionszyklus verhalten, da bisher keine Antikörper gegen TFIIIC2 und auch nicht gegen TFIIIC1 zur Verfügung standen. Diese Frage könnte für TFIIIC2 ebenfalls sehr interessant sein, da auch mit diesem Faktor isolierte VAI-Transkriptionskomplexe signifikant stimuliert werden konnten (Abb. 18). Da inzwischen Interaktionen von mehreren Untereinheiten von TFIIIC2 mit der Polymerase gezeigt werden konnten (Hsieh et al., 1999a), ist es nicht unwahrscheinlich, dass TFIIIC2 eine über die Aktivität eines „Assembly“-Faktors“ hinausgehende Mitwirkung bei der Polymeraserekrutierung während der Reinitiation spielt.

Interessanterweise konnten die nach 6 Nukleotiden arretierten Transkriptionskomplexe nach der Isolierung nicht durch Polymerasezugabe stimuliert werden (Abb. 18). Zwei mögliche Erklärungsmöglichkeiten erscheinen hierfür plausibel. Zum einen ist es möglich, dass die Präinitiationskomplexe während der Assemblierungsphase nahezu quantitativ mit der Polymerase komplexiert wurden und dass die Polymerase während der Zentrifugation fest mit dem Komplex verbunden blieb. Zum anderen ist es auch möglich, dass diejenigen Präinitiationskomplexe, die keine Polymerase rekrutiert haben, nicht genügend Stabilität aufwiesen, um die Zentrifugation zu überstehen. In jedem Fall scheint die arretierte Polymerase sehr fest mit dem Transkriptionskomplex assembliert zu sein. Entsprechende Untersuchungen an Komplexen, die zum Zeitpunkt der Zentrifugation bereits zyklisch transkribierten, sowie „Template Commitment“ Studien mit isolierten Transkriptionskomplexen könnten weitere Aufschlüsse über die Stabilität der Verankerung der humanen Polymerase im Transkriptionskomplex liefern.

4.5. Der Einfluss der 5'-flankierenden Sequenzen auf die Transkriptionseffizienz genintern regulierter Pol III Gene

Während alle RNA-Polymerase I und II abhängigen Gene Promotoren tragen, deren Promotorelemente stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription lokalisiert sind, befinden sich die Promotoren der „klassischen“ Pol III Gene innerhalb der für die RNA kodierenden Sequenz. Auch die Assemblierung der Transkriptionsfaktoren

TFIIIC2 (am VAI-Gen) bzw. TFIIIA und TFIIIC2 (an 5S) findet im Bereich der kodierenden Sequenz statt. Der jeweilige Footprint reicht im Falle des humanen 5S-Gens bis an den Startpunkt der Transkription (Oettel et al., 1997). Umstritten ist, ob TFIIIC1 eine direkte DNA-Interaktion eingeht.

Interessanterweise ist die kodierende Sequenz des 5S-Gens hoch konserviert zwischen so verschiedenen Organismen wie Hefe und Mensch, obwohl die beteiligten Transkriptionsfaktoren sehr unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen. So zeigt z.B. TFIIIA aus der Hefe nur geringe Homologie zu den entsprechenden Faktoren aus *Xenopus* und Mensch. Und auch die primär-DNA bindende Komponente des Transkriptionsfaktors IIIC2 (TFIIIC220) zeigt keine Homologien zu 138, der entsprechenden Untereinheit des Hefe-TFIIIC-Komplexes (siehe 1.4.).

Demgegenüber sind die 5'-flankierenden DNA-Sequenzen bereits innerhalb der Säugetiere sehr verschieden und zeigen keine Homologien zum *Xenopus* 5S-Gen. Eine Ausnahme hierbei bildet allerdings das Basenpaar -1, das hochkonserviert vorliegt (Hallenberg et al., 1994). Umso interessanter ist es, dass bei den drei untersuchten Säugetieren Mensch, Maus und Hamster eine 12 Bp lange Sequenz konserviert ist, die im 5'-flankierenden Bereich liegt und als D-Box bezeichnet wird. Deletionen des flankierenden Bereiches bis direkt an die 5'-Grenze dieses Elements führten zu keiner negativen oder positiven Beeinflussung der Transkriptionseffizienz. Wurden hingegen die Deletionen in den Bereich der D-Box bis zum Startpunkt ausgeweitet, führte dies zu einem massiven Einbruch der Transkriptionsrate (Nielsen et al., 1993; Haertel, 1995). Dies deutete auf eine essentielle Funktion der D-Box für eine effiziente Transkription des 5S-Gens hin. Weiterhin zeigten Insertionen, die zwischen D-Box und Startpunkt erfolgten, dass auch die Lokalisation der Box wichtig für seine Funktion ist, denn alle diese Mutanten wurden im Vergleich zum Wildtyp ineffektiv transkribiert (Haertel, 1995).

4.6. Die D-Box ist essentiell für eine effektive Transkription des humanen 5S-Gens, nicht aber für die Startpunktfestlegung der Transkription

Ein Grundproblem aller bisherigen Untersuchungen war, dass vergleichende Analysen der 5S-rRNA-Transkription mit sehr unterschiedlichen 5S-DNA-Konstrukten durchgeführt wurden. So wurde unter anderem die Transkription an einem

„synthetischen“ 5S-Gen mit der am genomischen pBh5S wt verglichen. Solche synthetischen Konstrukte wurden aus der RNA-Sequenz abgeleitet und tragen somit nur den kodierenden Teil des humanen 5S-Gens. Der gesamte 5'-Bereich wie auch der extrem thymineiche 3'-Bereich hinter dem Terminator fehlen hier völlig. Zudem ist das synthetische Gen in pUC, das genomische Gen aber in pBluescript integriert. Aber auch die beiden Konstrukte pBh5S wt und die davon abgeleitete Mutante pBh5S-5', welcher der gesamte 5'-Bereich fehlt, sind nur schwer miteinander zu vergleichen, wenn die Rolle der D-Box spezifisch untersucht werden soll. So ist zum Beispiel das ansonsten hochkonservierte Basenpaar -1 (Hallenberg et al., 1994) auf der Mutante nicht erhalten.

Daher wurden zu Beginn der Untersuchungen zunächst Plasmide konstruiert, die die Analyse der D-Box-Funktion ermöglichen, ohne dass dabei Beeinflussungen durch andere DNA-Regionen diese Analyse stören können. Ausgehend von der Mutante pB5SEhel forward wurden Plasmide erzeugt, in denen der gesamte 5'-Bereich stromaufwärts von der D-Box deletiert ist, der Bereich zwischen D-Box und Startpunkt hingegen identisch mit der Wildtyp-Sequenz ist (siehe 3.2.1., Übersicht 3 und 4). Die Plasmide pBEhe5S wt und pBEhe5S D-Box unterscheiden sich in ihrer gesamten Sequenz lediglich in vier Basen innerhalb der D-Box. Ein drittes Plasmid wurde ebenfalls erzeugt, das die Wildtyp-D-Box trägt, aber im ebenfalls zwischen Maus, Mensch und Hamster konservierten Palindrom GGCGCC (invariables Element) mutiert ist (pBEhe5S IvE).

Wie Abb. 19 zeigt, wurde das neu konstruierte pBEhe5S wt mit S100 ähnlich effizient transkribiert wie das genomische pBh5S wt. Auch die Länge der erhaltenen Transkripte fiel gleich aus. Dies bestätigt ältere Annahmen, dass der Bereich oberhalb der D-Box, inklusive einer möglichen Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor SP1, nicht entscheidend für die Effizienz der 5S-Transkription ist (siehe oben). pBEhe5S wt wurde hingegen je nach S100-Präparation ca. 4 bis 10 mal so stark transkribiert wie die D-Box Mutante pBEhe5S D-Box, wobei die Länge der synthetisierten RNA identisch war (Abb. 19 und weitere Daten nicht gezeigt). Da die verwendeten Plasmidpräparationen die gleiche Reinheit und die gleiche Helikalität aufwiesen (Daten nicht gezeigt), muss dieser Unterschied auf die vier mutierten Basen innerhalb der D-Box zurückzuführen sein.

Das Defizit der Transkriptionseffizienz von pBEhe5S D-Box lag im gleichen Bereich wie das der Komplettdelentionsmutante pBh5S-5'. Letztere zeigte zudem aber auch

ein weniger definiertes Transkriptionssignal. Diese Daten deuten darauf hin, dass die D-Box nicht verantwortlich ist für die korrekte Startpunktfestlegung durch die Polymerase. Die abweichenden Transkriptlängen der 5'-Komplettdeletionsmutante lassen vermuten, dass andere Elemente des 5'-Bereichs zwischen D-Box und Startpunkt der RNA-Synthese hierfür sehr wohl essentiell sind. Da die Mutante pBEhe5S_{lvE} sowohl in ihrer Effizienz wie auch in der Transkriptlänge identisch wie pBEhe5S_{wt} transkribiert wurde (Daten nicht gezeigt), ist eine solche Rolle für das invariable Element ebenfalls auszuschließen. Möglicherweise ist das mutierte Basenpaar -1 in pBh5S-5' für die fehlerhafte Initiation verantwortlich.

Somit war es gelungen, zwei Plasmide zu konstruieren, die in weitergehenden vergleichenden Analysen spezifische Aufschlüsse über die Wirkungsweise der D-Box geben könnten. Die weiteren Experimente wurden daher weitestgehend mit den pBEhe5S_{wt}/ D-Box-Plasmiden durchgeführt.

4.7. Gibt es einen eigenständigen spezifisch D-Box-bindenden Faktor?

Bisherige Versuche, einen D-Box-bindenden Faktor mittels EMSA nachzuweisen, waren nicht erfolgreich. Diese Experimente wurden mit zytoplasmatischem Extrakt an einem *AccI*-*Bam*HI-Fragment des Plasmides pBh5S_{wt} durchgeführt, das somit die gesamte 5'-flankierende Region, nicht aber die kodierende Sequenz des 5S-Gens trug (Haertel, 1995). Aus der Überlegung heraus, dass ein möglicher D-Box-bindender Faktor nicht nur die konservierte D-Box-Sequenz brauchen könnte um stabil zu binden, sondern auch einen Teil des angrenzenden kodierenden Bereiches, wurden im Gegensatz zu den bisherigen Experimenten in dieser Arbeit EMSAs an einem *Xho*I/*Bam*HI-Fragment aus dem subklonierten Plasmid pBEhe5S_{wt} durchgeführt. Dieses Fragment trägt neben der D-Box-Region auch den gesamten kodierenden Bereich des Gens. Als Kontrolle wurde ein entsprechendes Fragment aus dem mutierten pBEhe5S_{D-Box} eingesetzt. Außerdem wurden neben zytoplasmatischem Extrakt auch teilgereinigte PC-Fractionen verwendet, um etwaige spezifische Protein-DNA-Komplexe zu identifizieren. Allerdings konnte mit keiner dieser Fractionen ein Komplex detektiert werden, der spezifisch auf die D-Box zurückzuführen wäre. An beiden Fragmenten konnten hingegen mit der gleichen Sensitivität TFIIIA-DNA-Komplexe detektiert werden, wenn eine PCD oder eine PCAD eingesetzt wurde.

Da ein D-Box-spezifischer Protein-DNA-Komplex also auch an dem XhoI/BamHI-Fragment nicht nachzuweisen war, musste die Frage geklärt werden, ob ein möglicher D-Box-spezifischer Faktor überhaupt an lineare DNA binden kann. In allen bisherigen Untersuchungen von Nielsen et al. (1993) und Haertel (1995) wurden die Transkriptions-experimente ausschließlich an superhelikaler Plasmid-DNA durchgeführt. Daher wurden die gleichen DNA-Fragmente, die in den vorangegangenen EMSA-Experimenten eingesetzt wurden, auch als Matrize für eine *in vitro* Transkription verwendet. Da auch an diesen Fragmenten ein massiver Unterschied in der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp- und mutierter D-Box festzustellen war (Abb. 20), ist die Helikalität der DNA offenbar keine Notwendigkeit für den stimulierenden Einfluss der D-Box.

Die bisher diskutierten Ergebnisse sowie diejenigen der älteren Untersuchungen konnten also keine Anhaltspunkte für einen Faktor liefern, der von sich aus an die D-Box bindet und dort einen stabilen Komplex mit der DNA ausbildet. Hiervon ausgehend wurden mehrere Hypothesen für die Wirkungsweise der D-Box aufgestellt. Es war grundsätzlich nicht auszuschließen, dass ein solcher Komplex dennoch gebildet werden kann, aber nicht stabil genug ist, um die Elektrophorese zu überstehen. Eine zweite Möglichkeit ist, dass ein möglicher D-Box-bindender Faktor nur dann Zutritt zu seiner DNA-Sequenz findet, wenn vorher der Transkriptionskomplex an der DNA assembliert worden ist. Verschiedene Mechanismen einer solchen Interaktion sind denkbar.

So ist denkbar, dass der Faktor erst dann an die DNA binden kann, wenn die beiden Stränge voneinander entwunden sind, wie dies zum Beispiel bei der Ausbildung des „open complex“ der Fall ist. Zwar liegt die D-Box 21 Nukleotide vom Startpunkt entfernt, andererseits konnten in der Hefe recht große Transkriptionsblasen von über 20 Nukleotiden nachgewiesen werden (Kassavetis et al., 1992b). Von Haertel (1995) konnten einige DNA-Proteinkomplexe an einem D-Box-haltigen Einzelstrang-DNA-Fragment gezeigt werden, wobei deren Spezifität im Rahmen der Diplomarbeit nicht vollständig geklärt werden konnte. Daher wurden auch in der vorliegenden Arbeit Phosphocellulosefraktionen an Oligonukleotiden, die entweder die D-Box oder die mutierte D-Box trugen, im EMSA getestet. Alle gefundenen Protein-DNA-Komplexe erwiesen sich aber als nicht spezifisch für die D-Box (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Hypothese für die Funktion der D-Box ist, dass nicht ein eigenständiges Protein an diese Box bindet und damit eine Verstärkung der Transkription bewirkt,

sondern dass ein ohnehin beteiligter basaler Transkriptionsfaktor in dieser Sequenz eine Information findet, um koordiniert an die DNA zu binden. Die Frage, welche dieser Hypothesen zutrifft, sollte durch verschiedene Experimente entschieden werden.

Während bei Verwendung eines S 100 das D-Box-mutierte Gen sehr viel schwächer transkribiert wurde als das Wildtyp-5S-Gen, wurde dieser Unterschied bei Verwendung des teilrekonstituierten PC-Systems deutlich geringer. Dies ließ den Verdacht aufkommen, dass ein D-Box-spezifischer Faktor bei der Auftrennung des zytoplasmatischen Extraktes über Phosphocellulose partiell abgetrennt worden sein könnte. Es konnte aber weder in der PCA noch in der PCD eine Aktivität identifiziert werden, die spezifisch die Transkription des wt-5S-Gens stimulierte.

Der Austausch des PC-Transkriptionssystems gegen ein vollständig rekonstituiertes Transkriptionssystem führte zu keiner weiteren Angleichung der Transkriptionsrate zwischen Wildtyp-5S-Gen und D-Box-Mutante. Allerdings zeigte sich, dass dieser Unterschied abhängig war von der Stöchiometrie der eingesetzten Faktoren (siehe 4.8.).

Da es also nicht möglich war, einen eigenständigen D-Box-bindenden Faktor zu isolieren, und es ebenso nicht gelungen ist, durch Reinigung der Transkriptionsfaktoren einen solchen Faktor aus dem Transkriptionssystem abzutrennen, sollte auf indirektem Wege überprüft werden, ob die Existenz eines derartigen Faktors überhaupt wahrscheinlich ist. Sollte er tatsächlich existieren, aber nur dann an seine Zielsequenz binden können, wenn der Transkriptionskomplex assembliert wird, müsste er danach Bestandteil des Komplexes sein. An Matrizen, die keine D-Box enthalten, sollte hingegen der Transkriptionskomplex ohne diesen Faktor aufgebaut werden. In der Tat war es möglich, Transkriptionskomplexe an immobilisierter VAI-DNA zu assemblieren. Die Komplexe wurden anschließend gewaschen, weitgehend von nicht-inkorporierten Proteinen isoliert und danach die assemblierten Faktoren von der DNA eluiert. Solche Komplexeluate waren transkriptionsaktiv am VAI- und am tRNA-Gen (Abb. 22). Da in diesen Eluaten natürlich kein TFIIIA vorhanden war, mussten sie für eine Transkription am 5S-Gen mit dem fehlenden Faktor supplementiert werden. Die VAI-Eluate zeigten zusammen mit TFIIIA einen massiven Unterschied in der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp-5S-Gen und D-Box-mutiertem 5S-Gen. Dieser Befund spricht deutlich gegen die Existenz eines eigenständigen D-Box-bindenden Faktors, da dieser nicht in den

VAI-Transkriptionskomplexen integriert sein dürfte. Weiter unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass Transkriptionskomplexeluate, die an einem D-Box-mutierten 5S-DNA-Fragment assembliert worden waren, anschließend in der *in vitro* Transkription an pBEhe5S wt deutlich aktiver waren als an pBEhe D-Box (Abb. 23).

Nach der derzeitigen Datenlage muss daher eher davon ausgegangen werden, dass es keinen eigenständigen D-Box-bindenden Faktor gibt. Daher ist es am wahrscheinlichsten, dass einer der basalen Transkriptionsfaktoren im Bereich der D-Box eine (zusätzliche) Verankerung findet. Unter den beteiligten Transkriptionsfaktoren am Aufbau des Transkriptionskomplexes scheidet TFIIIA als möglicher Kandidat aus, da er an die ICR bindet. TFIIIC2 erweitert zwar den DNaseI-Footprint von TFIIIA bis in die Nähe des Startpunkts, bislang konnte aber nie ein Footprint von TFIIIC2 im 5'-flankierenden Bereich des Gens nachgewiesen werden. So bleiben TFIIIC1 und TFIIIB β als mögliche Interaktionspartner der D-Box übrig. Zwar konnte in unserem Labor noch keine Interaktion von TFIIIC1 mit 5S-DNA festgestellt werden, trotzdem ist nicht auszuschließen, dass im Zuge der Komplexassemblierung eine Interaktion dieses Faktors mit der D-Box stattfindet. Aufgrund der Lage der D-Box im 5'-flankierenden Bereich des Gens ist allerdings TFIIIB β von beiden Faktoren der wahrscheinlichere Kandidat. Einige neuere Daten sprechen dafür, dass er ähnlich an klassische Pol III Gene assembliert wird wie yTFIIIB in der Hefe. Letzterer wird durch Interaktion mit 131 in den Transkriptionskomplex eingebunden und erweitert den yTFIIIC-Footprint an tRNA-Genen wie auch am 5S-Gen bis in den Bereich von Bp -40 (siehe 1.4.1., 1.4.2 und 1.5.1.).

Ein weiteres Indiz dafür, dass TFIIIB β im 5'-flankierenden Bereich von klassischen Pol III Genen mit der DNA interagieren könnte, ergab sich aus Experimenten an dem normalerweise Pol II abhängigen Enten-H5-Gen. Die TATA-Box dieses Gens reicht von -20 bis -26. Durch Inkubation mit der DNA kann TFIIIB β an dieses Element assemblieren und dann mithilfe von TFIIIC1 die Polymerase III rekrutieren. Die Initiation der Pol III erfolgt dann am gleichen Startpunkt, an dem normalerweise die Pol II ihre RNA-Synthese beginnt (Kober et al., 1998).

Interessanterweise konnte jüngst gezeigt werden, dass die korrekte Bindung von yTFIIIB an die DNA nicht nur auf der Positionierung durch yTFIIIC, sondern auch auf einer Interaktion mit einer TATA-Box-ähnlichen Sequenz im 5'-Bereich des SUP4-

tRNA^{Tyr}-Gens beruht. Interaktionen von TBP wurden im Bereich von Bp -30 bis -20 nachgewiesen (Persinger et al., 1999). Obwohl dieser Bereich fast genau der Lage der D-Box entspricht, ist aber in der Sequenz der D-Box kein TATA-ähnliches Motiv zu erkennen.

Weitere Experimente sind nötig, um definitiv entscheiden zu können, welcher basale Transkriptionsfaktor mit der D-Box interagiert. Neben Footprintstudien über die Bindung von TFIIIB β an die 5S-DNA könnten auch Cross-Link-Studien helfen, diese Frage zu klären. Hilfreich könnte in diesem Zusammenhang sein, dass es jüngst gelungen ist, das Gen für eine weitere Untereinheit des TFIIIB β -Komplexes (TFIIIB150) zu klonieren (Teichmann et al., 2000). Da in Kürze Antikörper gegen alle drei (bisher bekannten) Untereinheiten von TFIIIB β zur Verfügung stehen werden, könnte dies die Analyse der an die D-Box bindenden Polypeptide erleichtern.

4.8. Wie wirkt die D-Box?

Neben der Frage, welches Protein an die D-Box bindet, ist ebenso interessant, welchen funktionellen Hintergrund die Transkriptionsstimulation durch die D-Box hat. Einerseits war es denkbar, dass das Vorhandensein der D-Box zur Formation einer größeren Anzahl von Transkriptionskomplexen führt. Zusätzlich oder alternativ könnte die Stabilität der entstandenen Komplexe an der Wildtyp-DNA stabiler sein als an der D-Box-Mutante. Andererseits ist es möglich, dass die D-Box-Mutation weder die Anzahl der gebildeten Komplexe, noch deren Stabilität negativ beeinflusst, sondern die Reinitiationsrate der Transkriptionskomplexe, möglicherweise durch eine fehlerhafte Konformation des fertigen Transkriptionskomplexes, reduziert.

Ein indirekter Nachweis über die Anzahl der gebildeten Transkriptionskomplexe sollte sich aus den Experimenten ergeben, in denen vorassemblierte Transkriptionskomplexe nach ihrer Isolierung von der DNA eluiert wurden und die Eluate anschließend erneut auf ihre Transkriptionsaktivität überprüft wurden (Abb. 23). Bei einer erniedrigten Rate der Komplexbildung am mutierten 5S-Gen müssten in den Eluaten weniger Transkriptionsfaktoren (und weniger Polymerasen) enthalten sein als in den Wildtyp-Eluaten. Da das Eluat der D-Box-Mutante in der anschließenden Transkription an VAI sogar etwas aktiver war als das Wildtyp-Eluat und sich beide Eluate in der 5S-Transkription gleich aktiv zeigten, deutete dies daraufhin, dass die Anzahl der assemblierten Komplexe am 5S-Gen durch die D-

Box-Mutation nicht negativ beeinflusst wird (Abb. 23). Da die Komplexe während der Isolierungsprozedur mehrfach mechanischer Beanspruchung (z. B. durch die Waschschrte) ausgesetzt worden waren, war aufgrund dieser Daten ebenfalls nicht anzunehmen, dass Transkriptionskomplexe an der D-Box-Mutante weniger stabil sind als Wildtyp-Transkriptionskomplexe.

Da also weder die gebildete Anzahl noch die Stabilität der Transkriptionskomplexe durch die D-Box-Mutation beeinflusst zu sein schien, wurde überprüft, ob sich die Mutation der D-Box negativ auf die Reinitiationsrate der Transkriptionskomplexe auswirkt. Wurde mit Eluaten aus 5S-Transkriptionskomplexen erneut an pBEhe5S wt oder D-Box transkribiert, führte die Zugabe von TFIIC1 zu einer beträchtlichen Stimulation der Transkription. Wie bereits in 4.4. erläutert wurde, kommt TFIIC1 mit einiger Wahrscheinlichkeit eine Funktion bei der Rekrutierung der Polymerase in den Präinitiationskomplex zu (Kober et al., 1998). Daher ist es möglich, dass diese beobachtete Stimulation, ähnlich wie die Stimulation der über Glyzeringradienten gereinigten VAI-Komplexe, auf eine Erhöhung der Reinitiationsrate des Transkriptionskomplexes zurückzuführen ist. Interessanterweise wurde durch die nachträgliche TFIIC1-Zugabe die Transkription am D-Box-mutierten 5S-Plasmid reproduzierbar stärker stimuliert als am Wildtyp-5S-Gen (Abb. 23, andere Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte auch festgestellt werden, dass in einer Standard-Transkription die unterschiedliche Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp- und D-Box-mutiertem 5S-Gen abhängig war von der Stöchiometrie der eingesetzten Transkriptionsfaktoren. Steigende Mengen einer MQ-TFIIC1-Fraktion führten an beiden Genvarianten zu einer Verstärkung der Transkription (Abb. 24). Allerdings wurde die Mutante deutlich stärker stimuliert als das Wildtyp-Gen, sodass sich die Transkriptionseffizienz von Mutante und Wildtyp bei höheren TFIIC1-Konzentrationen allmählich annäherte. Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass eine Erhöhung der TFIIC1-Konzentration zu einer Erhöhung der Reinitiationsrate der Transkriptionskomplexe führt, wobei im Falle des D-Box-mutierten 5S-Gens eine partielle Kompensation einer möglichen defekten Reinitiationsfähigkeit eintritt.

Da TFIIC1 neben seiner möglichen Funktion als Reinitiationsfaktor mit hoher Wahrscheinlichkeit auch als „Assembly-Faktor“ agiert und für die Integration von TFIIB in den Transkriptionskomplex benötigt wird (Hafner, 1999), musste überprüft werden, ob diese beobachtete partielle Angleichung der Transkriptionseffizienz von

5S-Wildtyp-Gen und D-Box-Mutante tatsächlich nur auf einer Angleichung der Reinitiationsrate beruht.

Diese Hypothese konnte aber durch das in Abb. 25 präsentierte Experiment nicht bestätigt werden. Zwar zeigte sich erneut, dass höhere TFIIIC1-Konzentrationen ein Angleichen des Unterschiedes der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und Mutante bewirkten. Interessanterweise stellte sich aber heraus, dass der Unterschied der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp und Mutante noch einmal geringer wurde, wenn vor der RNA-Synthesephase eine Vorinkubation eingefügt wurde, in der die Assemblierung der Transkriptionskomplexe erfolgte. Die Kombination aus hoher TFIIIC1-Konzentration und Vorinkubation sorgte sogar dafür, dass Wildtyp-Gen und D-Box-Mutante gleich stark transkribiert wurden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass sich die D-Box-Mutation nicht nur auf die Reinitiationsrate, sondern auch auf die Geschwindigkeit der Transkriptionskomplexassemblierung auswirkt und widersprechen somit partiell den zuvor gemachten Annahmen aus den Experimenten mit den Transkriptionskomplexeluat. Die ebenfalls durchgeführte „Single Round“-Transkription fiel ebenso deutlich schwächer an der D-Box-Mutante aus als am Wildtyp-5S-Gen, was ebenfalls dafür spricht, dass weniger Transkriptionskomplexe während der Vorinkubation ausgebildet wurden.

Möglicherweise sind unterschiedliche Inkubationsbedingungen und / oder andere verwendete Fraktionen für diese widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich. Während die Transkriptionskomplexe an den immobilisierten Matrizen in 60 Minuten assembliert wurden, betrug die Dauer der Assemblierung in Abb. 25 nur 45 Minuten. Außerdem wurden im ersten Fall ein teilrekonstituiertes Transkriptionssystem eingesetzt, in dem anderen ein vollständig rekonstituiertes System.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass der genaue Mechanismus der D-Box- bedingten Verstärkung der 5S-Transkription mit den vorliegenden Daten nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Die Frage, ob sich die Mutation dieses DNA-Elements negativ auf die Reinitiationsrate der Transkription und / oder auf die Geschwindigkeit der Transkriptionskomplexassemblierung auswirkt, bedarf weiterer Klärung. Inzwischen ist es gelungen, 5S-Transkriptionskomplexe über Glyzeringradienten zu isolieren. Diese so isolierten Komplexe waren an Wildtyp-5S-DNA aktiver als an D-Box-mutierter-5S-DNA (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise können Western Blot-Analysen solcher isolierter Komplexe, verbunden mit

detaillierteren Assemblierungskinetiken, diese Fragen beantworten. Weiterhin muss geklärt werden, ob alleine stöchiometrische Effekte der beteiligten Transkriptionsfaktoren, insbesondere die TFIIIC1-Konzentration dafür verantwortlich sind, dass der Unterschied der Transkriptionseffizienz zwischen Wildtyp-5S-DNA und D-Box-Mutante bei Einsatz von (teil-)rekonstituierten Transkriptionssystemen im Vergleich zu Transkriptionen mit Zellextrakten geringer wird.

Klar ist hingegen, dass hohe TFIIIC1-Konzentrationen die Effekte der D-Box-Mutation partiell kompensieren können. Da TFIIIC1 sowohl als Reinitiationsfaktor wie auch als Assemblyfaktor diskutiert wird, könnte die definitive Aufklärung der Frage, welchen funktionellen Effekt die D-Box-Mutation auf den Transkriptionskomplex hat, auch dazu beitragen, die Funktion von TFIIIC1 im Pol III Transkriptionskomplex weiter zu charakterisieren.

4.9. Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Methoden zur differenziellen Analyse der einzelnen Phasen der humanen Pol III Transkription erbrachten neue Erkenntnisse zur Zusammensetzung und Funktion von humanen Pol III Transkriptionskomplexen. Da geklärt werden konnte, dass La nicht als humaner Transkriptionsfaktor agiert und die La-RNA-Komplexbildung nicht funktionell mit der Transkription gekoppelt ist, ist dieser Themenbereich als abgeschlossen zu betrachten.

Die Funktion der basalen Transkriptionsfaktoren im Transkriptionskomplex der „klassischen“ Pol III Gene ist hingegen noch weitgehend unklar. Weiter untersucht werden müssen unter anderem die möglichen Funktionen von TFIIIC1. Neben der sich abzeichnenden Rolle als „Assembly-Faktor“ scheint auch die Reinitiation der RNA-Synthese von diesem Faktor abzuhängen. Genauere Aufschlüsse hierüber könnte u.a. die weitere Analyse der Funktion der D-Box des humanen 5S-Gens erbringen, da gezeigt werden konnte, dass eine hohe TFIIIC1-Konzentration die Auswirkungen einer mutierten D-Box partiell kompensieren kann. Vergleichende Untersuchungen über die Kinetik der Komplexassemblierung und der Reinitiationsrate am Wildtyp- und D-Box-mutierten 5S-Gen könnten hier Aufschluss bringen.

Da in Kürze weitere Antikörper gegen Untereinheiten der bekannten Transkriptionsfaktoren zur Verfügung stehen werden, kann die Western Blot-Analyse

von isolierten Transkriptionskomplexen ausgeweitet werden. Vielleicht kann so geklärt werden, ob TFIIIC2 bzw. TFIIIA nur als „Assembly-Faktoren“ für TFIIIB β agieren, wie dies in der Hefe für yTFIIIC und yTFIIIA gezeigt wurde, oder ob sie auch in den späteren Phasen des Transkriptionszyklus essentielle Funktionen wahrnehmen.

Ferner ist von Interesse, vergleichende Analysen von Transkriptionskomplexen an Pol III Genen unterschiedlicher Promotorstrukturen durchzuführen. Da es inzwischen auch gelungen ist, Transkriptionskomplexe, die an Fragment-DNA assembliert wurden, über Glyzeringradienten und Gelfiltration zu isolieren (Daten nicht gezeigt), sind vergleichende Footprintstudien der gesamten Komplexe denkbar. In naher Zukunft soll damit begonnen werden, die so gewonnenen Komplexe mittels 2D-Gelelektrophorese in Bezug auf ihre gemeinsame und unterschiedliche Polypeptidzusammensetzung zu analysieren. Möglicherweise kann so die Untereinheitenzusammensetzung des für alle Pol III Gene benötigten Transkriptionsfaktors TFIIIC1 ermittelt werden.

5. Zusammenfassung

Die Transkription der humanen RNA-Polymerase III abhängigen Gene ist ein in hohem Maße zyklischer Prozess. Nachdem der Transkriptionskomplex durch sukzessive Anlagerung der Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase assembliert worden ist, initiiert die Polymerase die Synthese der RNA (Initiation). Danach wird die RNA durch Einbau von Ribonukleotiden verlängert (Elongation). Am Terminator wird die fertige RNA entlassen (Termination), und anschließend wird die Polymerase erneut an den Initiator rekrutiert, um eine weitere Runde der Synthese einzuleiten (Reinitiation), wobei dem Terminator hierbei eine große Bedeutung zukommt. Ziel dieser Arbeit war es, den Ablauf der einzelnen Phasen dieses Zyklus zu analysieren und Informationen über die hieran beteiligten Transkriptionsfaktoren zu gewinnen.

Es ist gelungen, die Phase der Komplexassemblierung von den späteren Phasen des Transkriptionszyklus experimentell zu trennen. Transkriptionskomplexe, die aus gereinigten Transkriptionsfaktoren assembliert wurden, konnten direkt nach der Initiation arretiert werden, erwiesen sich aber weiterhin als voll elongations- und auch reinitiationskompetent. Solche assemblierten Transkriptionskomplexe konnten durch Zentrifugation über Glyzeringradienten von nicht inkorporierten Proteinen isoliert werden. Western Blot-Analysen der isolierten Komplexe zeigten, dass TBP (als Untereinheit von TFIIB β) integraler Bestandteil des humanen Pol III Transkriptionskomplexes ist und während des Transkriptionszyklus mit hoher Wahrscheinlichkeit fest mit dem Komplex assembliert bleibt.

Nach erfolgter Transkription wird die neusynthetisierte Pol III RNA von dem Autoantigen La durch Interaktion mit ihrem (Oligo)U-OH Ende komplexiert. Es ist postuliert worden, dass La für die Freisetzung der RNA am Terminator essentiell sei und somit als Terminationsfaktor agieren würde. Außerdem soll La auch für die erneute Rekrutierung der Polymerase an den Initiator benötigt werden. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen hingegen, dass La nicht an der Pol III Transkription beteiligt ist. Ein immunodepletiertes rekonstituiertes Transkriptionssystem, das kein nachweisbares La enthielt, war vollständig transkriptionsaktiv und konnte durch die Zugabe von rekombinantem La nicht weiter stimuliert werden. Immunopräzipitationen zeigten außerdem, dass die La-RNA-Komplexierung *in vitro* nicht mit der RNA-Synthese funktionell gekoppelt ist. Die weitere Analyse der isolierten

Transkriptionskomplexe ergab, dass La im Gegensatz zu TBP nicht mit dem humanen Transkriptionskomplex assoziiert vorliegt. Fraktionen der Glyzeringradienten, die Transkriptionskomplexe enthielten, aber nachweislich La-frei waren, waren transkriptionsaktiv für multiple Runden der Transkription und konnten durch Zugabe von rekombinantem La nicht weiter stimuliert werden. Somit ist eine Rolle von La als humaner Transkriptionsfaktor klar auszuschließen.

Die „klassischen“ Gene des Pol III Transkriptionssystems tragen ihre Promotorelemente innerhalb der kodierenden Sequenz. Das humane 5S-Gen besitzt allerdings zusätzlich eine konservierte 12 Bp-Sequenz im 5'-flankierenden Bereich des Gens, die als „D-Box“ bezeichnet wird. Eine Mutation dieses Elements führt zu einer massiven Verringerung der Transkriptionseffizienz, während die korrekte Festlegung des Startpunktes der Transkription nicht beeinträchtigt wird. Trotz intensiver Suche konnte weder durch EMSA-Analysen noch durch funktionelle Untersuchungen in der *in vitro* Transkription ein eigenständiger D-Box-spezifischer Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden. Es kann daher mit einiger Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass einer der basalen Transkriptionsfaktoren an diese Sequenz bindet. Interessanterweise können die Auswirkungen der D-Box-Mutation durch eine Erhöhung der TFIIIC1-Konzentration partiell kompensiert werden.

6. Abkürzungen

A	Adenin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
A.bid.	Aqua bidest
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BA	N,N-Methylenbisacrylamid
Bp	Basenpaar
BSA	"Bovine Serum Albumin" (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	„copy“ DNA
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm ("calf intestine alkaline phosphatase")
cpm	"counts per minute" (Impulse pro Minute)
CTP	Cytidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethan
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("acid")
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSE	Distales Sequenzelement
DTT	Dithiothreitol
EBER-RNA	Epstein-Barr-Virus assoziierte RNA
ECL	"Enhance Chemolumineszenz"
<i>E. coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
EDF	EMD-DEAE Fractogel 650S
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N'-tetraacetat
EMSA	"Electrophoretic mobility shift assay"
et al.	„et aliter“ (und andere)
Fc	"Fragment crystallizable" (Immunglobulin-Fragment)
FKS	Fötales Kälberserum
FPLC	"Fast Performance Liquid Chromatography"
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
h	human
HEK	"human embryonic kidney"
HeLa	Zelllinie eines humanen Cervix-Karzinoms

Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
hnRNA	heterogen nukleäre RNA
ht ^{met} RNA	humane Methionin-Initiator-Transfer-RNA
ICR	"internal control region"
IE	"intermediate element"
IgG	Immunglobulin G
IvE	Invariables Element
kB	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton (Masseneinheit)
KE	Kernextrakt
LB-Medium	Luria-Bertoni-Medium
Lsg.	Lösung
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Min.	Minute
MQ	Mono Q
mRNA	Boten-RNA ("messenger" RNA)
ng	Nannogramm
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBP	PSE-bindendes Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung („phosphate-buffered-saline“)
PC	Phosphocellulose
PC4	„Positive Cofactor 4“
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch
PCR	Polymerase Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PCV	"packed cell volume"
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol I, II und III	RNA Polymerase I, II, und III
Poly-(dAdT)	Poly-(desoxyadenosin-desoxthymidin)
Poly-(dIdC)	Poly-(desoxyinosin-desoxcytidin)
pH	Wasserstoffexponent (neg. dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PSE	Proximales Sequenzelement
pUC	Plasmid of University of California
QS	Q Sepharose
r	rekombinant

RA	Retardation Assay (EMSA)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	„Ribonucleoprotein Particle“
RPC	RNA Polymerase C (III) (Untereinheit der Pol III)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit (Sedimentationskoeffizient)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
SDS	Natrium- ("sodium-") Dodecylsulfat
sek.	Sekunde
SNAPc	"snRNA-activating protein complex"
snRNA	"small nuclear" RNA
Sp	"stimulating protein" (stimulierendes Protein)
SV	Säulenvolumen
T	Thymin
TAF	TBP assoziierter Faktor
TBA	Terminationsregion bindende Aktivität
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TFI, II, und III	Transkriptionsfaktor der RNA-Polymerase I, II und III
	„Trademark“
Tris	Tris-hydroxy-ethyl-aminomethan
tRNA	„transfer“ RNA
TTFI	„transcription termination factor“ 1
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Einheit der jeweiligen Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen ("volume per volume")
V	Volt (Maß für elektrische Spannung)
Vol.	Volumen
VA RNA	virus-assoziierte RNA (hier: ausschließlich VA1 RNA des Adenovirus)
VT	Volumenteile
W	Watt
w/v	Gewicht/Volumen ("weight per volume")

X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- -D-Galaktosid
<i>X.l.</i>	<i>Xenopus laevis</i>
y	"yeast" (Hefe)
z. B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

7. Literaturverzeichnis

Andrau, J.-C., Sentenac, A. und Werner, M., 1999

Mutagenesis of yeast TFIIIB70 reveals C-terminal residues critical for interaction with TBP and C34.

J. Mol. Biol. **288**, 511-520

Arakawa, H., Nagase, H., Hayashi, M., Ogawa, M., Nagata, M., Fujiwara, T., Takahashi, E., Shin, S. und Nakamura, Y., 1995

Molecular cloning, characterization, and chromosomal mapping of a novel human gene (GTF3A) that is highly homologous to *Xenopus* transcription factor IIIA.

Cytogenet Cell Genet **70**, 235-238

Archambault, J., Milne, C.A., Schappert, K.T., Baum, B., Friesen, J.D. und Segall, J., 1992

The deduced sequence of the transcription factor TFIIIA from *Saccharomyces cerevisiae* reveals extensive divergence from *Xenopus* TFIIIA.

J. Biol. Chem. **267**, 3282-3288

Arrebola, R., Manaud, N., Rozenfeld, S., Marsolier, M.-C., Lefebvre, O., Carles, C., Thuriaux, P., Conesa, C. und Sentenac, A., 1998

_91, an essential subunit of yeast transcription factor IIIC, cooperates with _138 in DNA binding.

Mol. Cell. Biol. **18**, 1-9.

Baker, R.E., Camier, S., Sentenac, A. und Hall, B.D., 1987

Gene size differentially affects the binding of yeast transcription factor to two intragenic regions.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 8768-8772

Bardeleben, C., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P., 1994

Encounters of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III with its transcription factors during RNA chain elongation.

J. Mol. Biol. **235**, 1193-1205

Bartholomew, B., Kassavetis, G.A., Braun, B.R. und Geiduschek, E.P., 1990

The subunit structure of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor IIIC probed with a novel photocrosslinking reagent.

EMBO J. **9**, 2197-2205.

Bartholomew, B., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P., 1991

Two components of *Saccharomyces cerevisiae* TFIIIB are stereospecifically located upstream of a tRNA gene and interact with the second-largest subunit of TFIIIC.

Mol. Cell. Biol. **11**, 5181-5189

Bieker, J.J., Martin, P.L. und Roeder, R.G., 1985

Formation of a rate-limiting intermediate in 5S RNA gene transcription.

Cell **40**, 119-127

Blum, H., Beier, H. und Gross, H., 1987

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.

Electrophoresis **8**, 93-99

Bobkova, E.V. und Hall, B.D., 1997

Substrate specificity of the RNase activity of yeast RNA polymerase III.

J. Biol. Chem. **272**, 22832-22839

Boelens, W.C., Palacios, I. und Mattaj, I.W., 1995

Nuclear retention of RNA as a mechanism for localisation.

RNA **1**, 273-283

Bogenhagen, D.F., Sakonju, S. und Brown, D.D., 1980

A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: II. The 3'-border of the region.

Cell **19**, 27-30

Bogenhagen, D.F. und Brown, D.D., 1981

Nucleotide sequences in *Xenopus* 5S DNA required for transcription termination.

Cell **24**, 261-270

Bogenhagen, D.F., Wormington, W.M. und Brown, D.D., 1982

Stable transcription complexes of *Xenopus* 5S RNA genes: A means to maintain the differentiated state.

Cell **28**, 413-421

Bradford, M.M., 1976

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding.

Anal. Biochem. **72**, 248-254

Braun, B.R., Riggs, D.L., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P., 1989

Multiple states of protein-DNA interaction in the assembly of transcription complexes on *Saccharomyces cerevisiae* 5S ribosomal RNA genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 2530-2534

Brun, I., Sentenac, A. und Werner, M., 1997

Dual role of the C34 subunit of RNA polymerase III in transcription initiation.

EMBO J. **16**, 5730-5741

Buratowski, S. und Zhou, H., 1992

A suppressor of TBP mutations encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIB

Cell **71**, 221-230

Campbell, F.E. Jr. und Setzer, D.R., 1992

Transcription termination by RNA polymerase III: uncoupling of polymerase release from termination signal recognition.

Mol. Cell. Biol. **12**, 2260-2272

Cannon, R.E., Wu, G.J. und Railey, J.F., 1986

Functions of and interactions between the A and B blocks in adenovirus type 2-specific VARNA1 gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 1285-1289

Chambon, P., 1975

Eucaryotic nuclear polymerases.

Ann. Rev. Biochem. **44**, 613-638

Chaussivert, N., Conesa, C., Shaaban, S. und Sentenac, A., 1995

Complex interactions between yeast TFIIB and TFIIC.

J. Biol. Chem. **270**, 15353-15358

Chargaff, E., 1955

Isolation and composition of the desoxypentose nucleic acid and the corresponding nuclear proteins.

Nucl. Acids Res. **1**, 307-407

Chédin, S., Riva, M., Schultz, P., Sentenac, A. und Carles, C., 1998

The RNA cleavage activity of RNA polymerase III is mediated by an essential TFIIIS-like subunit and is important for transcription termination.

Genes Dev **12**, 3857-3871

Chiang, C.-M., Ge, H., Wang, Z., Hoffmann, A. und Roeder, R.G., 1993

Unique TATA-binding protein-containing complexes and cofactors involved in transcription by RNA-polymerases II and III.

EMBO J. **12**, 2749-2762

Ciliberto, G., Raugei, G., Costanzo, F., Dente, L. und Cortese, R., 1983

Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase III.

Cell **32**, 725-733

Colbert, T. und Hahn, S., 1992

A yeast TFIIB-related factor involved in RNA polymerase III transcription.

Genes Dev **6**, 1940-1949.

- Conesa**, C., Swanson, R.N., Schultz, P., Oudet, P. und Sentenac, A., 1993
On the subunit composition, stoichiometry, and phosphorylation of the yeast transcription factor TFIIC/_.
J. Biol. Chem. **268**, 18047-18052.
- Craig**, A.W.B., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Belsham, G.J. und Sonenberg, N., 1997
The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation
Mol. Cell. Biol. **17**, 163-169
- Dagert**, K. und Ehrlich, E., 1979
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells.
Gene **6**, 23-31
- Dean**, N. und Berk, A.J., 1987
Separation of TFIIC into two functional components by sequence specific DNA affinity chromatography.
Nucl. Acids Res. **15**, 9895-9907
- Dean**, N. und Berk, A.J., 1988
Ordering promotor binding of class III transcription factors TFIIC1 and TFIIC2.
Mol. Cell. Biol. **8**, 3017- 3025
- Del Rio**, S. und Setzer, D.R., 1993
The role of zinc fingers in transcriptional activation by transcription factor IIIA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 168-172
- Dieci**, G., Duimio, L., Coda-Zabetta, F., Sprague, K.U. und Ottonello, S., 1993
A novel RNA polymerase III transcription factor fraction that is not required for template commitment.
J. Biol. Chem. **268**, 11199-11207
- Dieci**, G., Hermann-Le Denmat, S., Lukhtanov, E., Thuriaux, P., Werner, M. und Sentenac, A., 1995
A universally conserved region of the largest subunit participates in the active site of RNA polymerase III.
EMBO J. **14**, 3766-3776
- Dieci**, G. und Sentenac, A., 1996
Facilitated recycling pathway for RNA polymerase III.
Cell **84**, 245-252
- Drew**, P.D., Nagle, J.W., Canning, R.D., Ozato, K., Biddison, W.E. und Becker, K.G., 1995
Cloning and expression analysis of a human cDNA homologous to *Xenopus* TFIIIA.
Gene **159**, 215-218.

Engelke, D.R., Ng, S.-Y., Shastry, B.S. und Roedder, R.G., 1980

Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S genes.

Cell **19**, 717-728

Fabrizio, P., Coppo, A., Fruscoloni, P., Benedetti, P., Di Segni, G. und Tocchini-Valentini, G.P., 1987

Comparative mutational analysis of wild-type and stretched tRNA^{Leu} gene promoters.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 8763-8767

Fan, H., Sakulich, A.L., Goodier, J.L., Zhang, X., Qin, J. und Maraia, R.J., 1997

Phosphorylation of the human La antigen on serin 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes.

Cell **88**, 707-715

Fan, H., Goodier, J.L., Chamberlain, J.R., Engelke, D.R. und Maraia, R.J., 1998

5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein.

Mol. Cell. Biol. **18**, 3201-3211

Ferri, M.-L., Peyroche, G., Siaut, M., Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C. und Sentenac, A., 2000

A novel subunit of yeast RNA polymerase III interacts with the TFIIIB-related domain of TFIIIB70.

Mol. Cell. Biol. **20**, 488-495

Fowlkes, D.M. und Schenk, T., 1980

Transcriptional control regions of the adenovirus VAI RNA gene.

Cell **22**, 405-413

Fradkin, L.G., Yoshinaga, S.K., Berk, A.J. und Dasgupta, A., 1989

Human transcription factor TFIIIC2 specifically interacts with a unique sequence in the *Xenopus laevis* 5S rRNA gene.

Mol. Cell. Biol. **9**, 4941- 4950

Francoeur, A.M. und Mathews, M.B., 1982

Interaction between VA RNA and the lupus antigen La: Formation of a ribonucleoprotein particle in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 6772-6776

Gabrielsen, O.S., Marzouki, N., Ruet, A., Sentenac, A. und Fromageot, P., 1989

Two polypeptide chains in yeast transcription factor interact with DNA.

J. Biol. Chem. **264**, 7505-7511

Gabrielsen, O.S. und Sentenac, A., 1991

RNA polymerase III (C) and its transcription factors.

TIBS **16**, 412-416

Geiduschek, E.P. und Tocchini-Valentini, G.P., 1988

Transcription by RNA-polymerase III.

Ann. Rev. Biochem. **57**, 873-914

Geiduschek, E.P. und Kassavetis, G.A., 1992

RNA-polymerase III transcription complexes.

In: Transcriptional Regulation (Hrsg. S.L. McKnight und K.R. Yamamoto)

S. 247-280, *Cold Spring Harbor Press, New York*

Ginsberg, A.M., King, B.O. und Roeder, R.G., 1984

Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIIA: Characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development.

Cell **39**, 479-489

Goodier, J.L., Fan, H. und Maraia, R.J., 1997

A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein.

Mol Cel. Biol. **17**, 5823-5832

Goodier, J.L. und Maraia, R.J., 1998

Terminator-specific recycling of a B1-Alu Transcription Complex by RNA polymerase III is mediated by the RNA Terminus-binding protein La.

J. Biol. Chem. **40**, 26110-26116

Gottlieb, E. und Steitz, J.A., 1989a

The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription *in vitro*.

EMBO J. **8**, 841-850

Gottlieb, E. und Steitz, J.A., 1989b

Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III.

EMBO J. **8**, 851-861

Grimm, C., Lund, E. und Dahlberg, J.E., 1997

Selection and nuclear immobilization of exportable RNAs.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 10122-10127

Grummt, I., 1981

Specific transcription of mouse ribosomal DNA in a cell-free system that mimics control *in vivo*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 721-731

Grummt, I., Rosenbauer, H., Niedermeyer, I., Maier, U. und Ohrlein, A., 1986

A repeated 18 bp sequence motif in the mouse rDNA spacer mediates binding of a nuclear factor and

transcription termination.

Cell **45**, 837-846

Guilfoyle, R. und Weinmann, R., 1981

Control region for adenovirus VA RNA transcription.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 3378.3382

Haertel, F., 1995

Charakterisierung regulatorischer Sequenzen im 5'-Bereich des humanen 5S rRNA-Gens.

Diplomarbeit am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Haertel, F., 1999

Untersuchungen zur Regulation RNA-Polymerase III transkribierter Gene während der G0-Phase des Zellzyklus.

Promotionsarbeit am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Hafner, H., 1999

Reinigung und funktionelle Charakterisierung des Transkriptionsfaktors IIIC1 der RNA-Polymerase III.

Diplomarbeit am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Hallenberg, C., Nielsen, J.N. und Frederiksen, S., 1994

Characterization of 5S rRNA genes from mouse.

Gene **142**, 291-295

Henry, R.W., Sadowski, C.L., Kobayashi, R. und Hernandez, N., 1995

A TBP-TAF complex required for transcription of human snRNA genes by RNA polymerase II and III.

Nature **374**, 653-656

Hernandez, N., 1992

Transcription of vertebrate snRNA genes and related genes.

In: Transcriptional Regulation (Hrsg. S.L. McKnight und K.R. Yamamoto)

S. 281-314, *Cold Spring Harbor Press, New York*

Hoeffler, W.K., Kovelman, R. und Roeder, R.G., 1988

Activation of transcription factor IIIC by the adenovirus E1A protein.

Cell **53**, 907-920

Hofstetter, H., Kressman, A. und Birnstiel, M.L., 1981

A split promoter for a eucaryotic tRNA gene.

Cell **24**, 573-585

Honda, B.M. und Roeder, R.G., 1980

Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell

differentiation.

Cell **22**, 119-126

Hsieh, Y.-J., Wang, Z., Kovelman, R. und Roeder, R.G., 1999a

Cloning and characterization of two evolutionarily conserved subunits (TFIIIC102 and TFIIIC63) of human TFIIIC and their involvement in functional interactions with TFIIIB and RNA polymerase III.

Mol. Cell. Biol. **19**, 4944-4952

Hsieh, Y.-J., Kundu, T.K., Wang, Z., Kovelman, R. und Roeder, R.G., 1999b

The TFIIIC90 subunit of TFIIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity.

Mol. Cell. Biol. **19**, 7697-7704

Huet, J. und Sentenac, A., 1992

The TATA-binding protein participates in TFIIIB assembly on tRNA genes.

Nucleic Acids Res. **20**, 6451-6454

Hühn, Peter, Pruijn, G.J.M., Van Venrooij, W.J. und Bachmann, M., 1997

Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme.

Nucleic Acids Res. **25**, 410-416

Ittmann, M., Ali, J., Greco A. und Basilico C., 1993

The gene complementing a temperature-sensitive cell cycle mutant of BHK cells is the human homologue of the yeast RPC53 gene, which encodes a subunit of RNA polymerase C (III).

Cell Growth Differ. **4**, 503-511

Izban, M.G. und Luse, D.S., 1992

The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3' → 5' direction in the presence of elongation factor SII.

Genes Dev. **6**, 1342-1356

Jahn, D., Wingender, E., Seifart, K.H., 1987

Transcription complexes for various class III genes differ in parameters of formation and stability towards salt.

J. Mol. Biol. **193**, 303-313

Kassavetis, G.A., Riggs, D.L., Negri, R., Nguyen, L.H. und Geiduschek, E.P., 1989

Transcription factor IIIB generates extended DNA interactions in RNA polymerase III transcription complexes on tRNA genes.

Mol. Cell. Biol. **9**, 2551-2566

Kassavetis, G.A., Braun, B.R., Nguyen, L.H. und Geiduschek, E.P., 1990

S. cerevisiae TFIIIB is the transcription factor proper of RNA-polymerase III, while TFIIIA and TFIIIC

are assembly factors.

Cell **60**, 235-245

Kassavetis, G.A., Bartholomew, B., Blanco, J.A., Johnson, T.E. und Geiduschek, E.P., 1991

Two essential components of the *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIIB: Transcription and DNA-binding properties.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 7308-7312

Kassavetis, G.A., Jaozeiro, C.A.P., Pisano, M., Geiduschek, E.P., Colbert, T., Hahn, S. und Blanco, J.A., 1992a

The role of the TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA-polymerase III transcription factor, TFIIIB.

Cell **71**, 1055-1064

Kassavetis, G.A., Blanco, J.A., Johnson, T.E. und Geiduschek, E.P., 1992b

Formation of open and elongating transcription complexes by RNA polymerase III.

J. Mol. Biol. **226**, 47-58

Kassavetis, G.A., Nguyen, S.T., Kobayashi, R., Kumar, A., Geiduschek, E.P. und Pisano, M., 1995

Cloning, expression, and function of TFC5, the gene encoding the B'' component of the *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III transcription factor TFIIIB.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 9786-9790

Khoo, B., Brophy, B. und Jackson, S.P., 1994

Conserved functional domains of the RNA polymerase III general transcription factor BRF.

Genes Dev **8**, 2879-2890

Kober, I., Teichmann, M., Seifart, K.H., 1998 hTFIIIB- β stably binds to pol II promoters and recruits RNA polymerase III in a hTFIIIC1 dependent way.

J. Mol. Biol. **284**, 7-20

Kovelmann, R. und Roeder, R.G., 1990

Sarkosyl defines three intermediate steps in transcription initiation by RNA polymerase III: application to stimulation of transcription by E1A.

Genes Dev. **4**, 646-658

Kovelmann, R. und Roeder, R.G., 1992

Purification and characterization of two forms of human transcription factor IIIC.

J. Biol. Chem. **267**, 24446-24456

Kuhn, A., Bartsch, I. und Grummt, I., 1990

Specific interaction of the murine transcription termination factor TTF I with class-I RNA polymerases.

Nature **344**, 559-562

Kyhse-Andersen, J., 1984

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J. Biochem. Biophys. Meth. **19**, 203-209

Laemmli, U.K., 1970

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**, 680-685

Lagna, C., Kovelmann, R., Sukegawa, J. und Roeder, R.G., 1994

Cloning and characterization of an evolutionary divergent DNA-binding subunit of mammalian TFIIIC.

Mol. Cell. Biol. **14**, 3053-3064

Lassar, A.B., Martin, P.L. und Roeder, R.G., 1983

Transcription of Class III genes: Formation of preinitiation complexes.

Science **222**, 740-748

Lefebvre, O., Carles, C., Conesa, C., Swanson, R.N., Bouet, F., Riva, M. und Sentenac, A., 1992

TFC3: Gene encoding the B-block binding subunit of the yeast transcription factor IIIC.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 10512-10516.

Lerner, M.R., Boyle, J.A., Hardin, J.A. und Steitz, J.A., 1981

Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with Lupus Erythematosus.

Science **211**, 400-402

L'Etoile, N.D., Fahnenstock, M.L., Shen, Y., Aebershold, R. und Berk, A.J., 1994

Human transcription factor IIIC box B binding subunit.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 1652-1656

Liao, X., Clemens, K.R., Tennant, L. und Wright, P.E., 1992

Specific interaction of the first three zinc fingers of TFIIIA with the internal control region of the *Xenopus* 5S RNA gene.

J. Mol. Biol. **223**, 857-871

Lin-Marq, N. und Clarkson, S.G., 1995

A yeast RNA binding protein that resembles the human autoantigen La.

J. Mol. Biol. **245**, 81-85

Lin-Marq, N. und Clarkson, S.G., 1998

Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in *Xenopus* extracts depleted of La protein.

EMBO J. **17**, 2033-2041

Lobo, S.M., Tanaka, M., Sullivan, M.L. und Hernandez, N., 1992

A TBP complex essential for transcription from TATA-less but not TATA-containing RNA-polymerase III promoters is part of the TFIIIB fraction.

Cell **71**, 1029-1040

López-De-León, A., Librizzi, M., Puglia, K. und Willis, I.M., 1992

PCF4 encodes an RNA polymerase III transcription factor with homology to TFIIIB.

Cell **71**, 211-220

Manaud, N., Arrebola, R., Buffin-Meyer, B., Lefebvre, O., Voss, H., Riva, M., Conesa, C. und Sentenac, A., 1998

A chimeric subunit of yeast transcription factor IIIC forms a subcomplex with 95.

Mol. Cell. Biol. **18**, 3191-3200

Mao, X. und Darby, M.K., 1993

A position-dependent transcription-activating domain in TFIIIA.

Mol. Cell. Biol. **13**, 7496-7506

Maraia, R.J., 1996

Transcription termination factor La is also an initiation factor for polymerase III.

Proc Natl. Acad. Sci. USA **93**, 3383-3387

Maraia, R.J., Kenan, D.J. und Keene, J.D., 1994

Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III.

Mol. Cell. Biol. **14**, 2147-2158

Marck, C., Lefebvre, O., Carles C., Riva, M., Chaussivert, N., Ruet, A. und Sentenac A., 1993

The TFIIIB-assembling subunit of yeast transcription factor TFIIIC has both tetratricopeptide repeats and basic helix-loop-helix motifs.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**, 4027-4031.

Marzouki, N., Camier, S., Ruet, A., Moenne, A. und Sentenac, A., 1986

Selective proteolysis defines two DNA binding domains in yeast transcription factor tau.

Nature **323**, 176-178

Matsuzaki, H., Kassavetis, G.A. und Geiduschek, E.P., 1994

Analysis of RNA chain elongation and termination by *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III.

J. Mol. Biol. **235**, 1173-1192

McLaren, R.S., Carrucio, N. und Ross, J., 1997

Human La protein: a stabilizer of histone mRNA.

Mol. Cell. Biol. **17**, 3028-3036

Meerovitch, K., Svitkin, Y.V., Lee, H.S., Lejbkowitz, F., Kenan, D.J., Chan, E.K.L., Agol, V.I., Keene, J.D. und Sonenberg, N., 1993

La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate.
J. Virology **67**, 3798-3807

Miller, J., McLachlan, A.D. und Klug, A., 1985

Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes.
EMBO J. **4**, 1609-1614

Moorefield, B. und Roeder, R.G., 1994

Purification and characterization of human transcription factor IIIA.
J. Biol. Chem. **269**, 20857-20865

Moss, T. und Stefanovsky, V.Y., 1995

Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I.
Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. **50**, 25-66

Murphy, S., Yoon, J.-B., Gerster, T. und Roeder, R.G., 1992

Oct-1 and Oct-2 potentiate functional interactions of a transcription factor with the proximal sequence element of small nuclear RNA genes.
Mol. Cell. Biol. **12**, 3247-3261

Nielsen, J.N., Hallenberg, C., Frederiksen, S., Sørensen, P.D. und Lomholt, B., 1993

Transcription of human 5S rRNA genes is influenced by an upstream DNA sequence.
Nucleic Acids Res. **21**, 3631-3636

Oettel, S., Haertel, F., Kober, I., Iben, S. und Seifart, K.H., 1997

Human transcription factors IIIC2, IIIC1 and a novel component IIIC0 fulfil different aspects of DNA binding to various pol III genes.
Nucleic Acids Res. **25**, 2440-2447

Oettel, S., Kober, I. und Seifart, K.H., 1998

The activity binding to the termination region of several pol III genes represents a separate entity and is distinct from a novel component enhancing U6 snRNA transcription.
Nucleic Acids Res. **26**, 4324-4331

Oshima, Y., Okada, N., Tani, T., Iton, Y. und Iton, M., 1981

Nucleotide sequences of mouse genomic loci including a gene or pseudogene for U6 (4.8S) nuclear RNA.
Nucl. Acids Res. **9**, 5145-5158

Pannone, B.K., Xue, D. und Wolin, S.L., 1998

A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular

chaperone for RNA polymerase III transcripts.

EMBO J. **17**, 7442-7453

Parsons, M.C. und Weil, P.A., 1990

Purification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor TFIIIC. Polypeptide composition defined with polyclonal antibodies.

J. Biol. Chem. **265**, 5095-5103.

Parsons, M.C. und Weil, P.A., 1992

Cloning of *TFC1*, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding the 95 kDa subunit of transcription factor TFIIIC.

J. Biol. Chem. **267**, 2894-2901.

Pelham, H.R.B. und Brown, D.D., 1980

A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 4170-4174

Persinger, J., Sengupta, S.M. und Bartholomew, B., 1999

Spatial organization of the core region of yeast TFIIIB-DNA complexes.

Mol. Cell. Biol. **19**, 5218-5234

Picard, B. und Wegnez, M., 1979

Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: A 5S RNA protein complex.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4170-4174

Pieler, T., Appel, B., Oei, S.L., Mentzel, H. und Erdmann, V.A., 1985a

Point mutational analysis of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter.

EMBO J. **4**, 1847-1853

Pieler, T., Oei, S.L., Hamm, J., Engelke, U. und Erdmann, V.A., 1985b

Functional domains of the *Xenopus laevis* 5S gene promoter.

EMBO J. **4**, 3751-3756

Pieler, T., Hamm, J. und Roeder, R.G., 1987

The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing.

Cell **48**, 91-100

Proudfoot, N., 2000

Connecting transcription to messenger RNA processing.

TIBS **25**, 290-293

Reines, D., 1992

Elongation factor-dependent transcript shortening by template-engaged RNA polymerase II.
J. Biol. Chem. **267**, 3795-3800

Reines, D., Conaway, J.W. und Conaway, R.C., 1996

The RNA polymerase II general elongation factors.
TIBS **21**, 351-355

Roberts, S., Miller, S.J., Lane, W.S., Lee, S. und Hahn, S., 1996

Cloning and functional characterization of the gene encoding the TFIIIB90 subunit of RNA polymerase III transcription factor TFIIIB.
J. Biol. Chem. **271**, 14903-14909

Rinke, J. und Steitz, J.A., 1982

Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La Lupus antibodies.
Cell **29**, 149-159

Roeder, R.G. und Rutter, W.J., 1969

Multiple forms of DNA dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms.
Nature **224**, 234-237

Roeder, R.G., 1996

The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II.
TIBS **21**, 327-334

Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R. und Steitz, J.A., 1981

Striking similarities are exhibited by small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAIL.
Mol. Cell. Biol. **1**, 785-796

Rothfels, H. 1998

Charakterisierung eines RNA-Polymerase III-Promotors mit varianter TATA-Box und veränderter TBP-Spezifität.
Diplomarbeit am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Rudd, M.D., Izban, M.G. und Luse, D.S., 1994

The active site of polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 8057-8061

Rüth, J., Conesa, C., Dieci, G., Lefebvre, O., Düsterhöft, A., Ottonello, S. und Sentenac, A., 1996

A suppressor of mutations in the class III transcription system encodes a component of yeast TFIIIB.
EMBO J. **15**, 1941-1949.

Sadhale, P.P. und Woychik, N.A., 1994

C25, an essential RNA polymerase III subunit related to the RNA polymerase II subunit RPB7.

Mol. Cell. Biol. **14**, 6164-6170

Sadowski, C.L., Henry, R.W., Lobo, S.M. und Hernandez, N., 1993

Targeting TBP to a non-TATA box cis-regulatory element: a TBP-containing complex activates transcription from snRNA promoters through the PSE.

Genes Dev **7**, 1535-1548

Sakonju, S., Bogenhagen, D.F. und Brown, D.D., 1980

A control region in the center of the 5S RNA gene directs specific initiation of transcription: I. The 5'-border of the region.

Cell **19**, 13-25

Santos, T. und Zasloff, M., 1981

Comparative analysis of human chromosomal segments bearing nonallelic dispersed tRNA^{met} genes.

Cell **23**, 699-709

Schneider, H.R., Waldschmidt, R., Jahn, D. und Seifart, K.H., 1989

Purification of human transcription factor IIIC and its binding to the gene for ribosomal 5S RNA.

Nucleic Acids Res. **17**, 5003-5016

Schultz, P., Marzouki, N., Marck, C., Ruet, A., Oudet, P. und Sentenac, A., 1989

The two DNA-binding domains of yeast transcription factor τ as observed by scanning transmission electron microscopy.

EMBO J. **8**, 3815-3824.

Schwartz, L., Sklar, V.E.F., Jaehning, J.A., Weinmann, R. und Roeder, R.G., 1974

Isolation and partial characterization of multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in the mouse myeloma MOPC 315.

J. Biol. Chem. **255**, 5889-5897

Segall, J., Matsui, T. und Roeder, R.G., 1980

Multiple factors are required for the accurate transcription of purified genes by RNA polymerase III.

J. Biol. Chem. **255**, 11986-11991

Seifart, K.H. und Sekeris, C.E., 1969

-Amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA polymerase.

Zeitschrift f. Naturforschung **246**, 1538-1544

Seifart, K.H., Wang, L., Waldschmidt, R., Jahn, D. und Wingender, E., 1989

Purification of human transcription factor IIIA and its interaction with a chemically synthesized gene encoding human 5S rRNA.

J. Biol. Chem. **264**, 1702-1709

Sentenac, A., Riva, M., Thuriaux, P., Buhler, J.-M., Treich., I., Carles, C., Werner, M., Ruet, A., Huet, J., Mann, C., Chiannikulchai, N., Stettler, S. und Mariotte, S., 1992

Yeast RNA polymerase subunits and genes.

In: Transcriptional Regulation (Hrsg. S.L. McKnight und K.R. Yamamoto)

S. 27-54, *Cold Spring Harbor Press, New York*

Shaaban, S.A., Bobkova, E.V., Chuzik, D.M. und Hall, B.D., 1996

In vitro analysis of elongation and termination by mutant RNA polymerases with altered termination behavior.

Mol. Cell. Biol. **16**, 6468-6476

Shapiro, D.J., Sharp, P.A., Wahli, W.W. und Keller, M.J., 1988

A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract.

DNA **7**, 47-55

Simons, F.H.M., Rutjes, S.A., Van Venrooij, W.J. und Pruijn, G.J.M., 1996

The interactions with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA.

RNA **2**, 264-273

Sinn, E., Wang, Z., Kovelmann, R. und Roeder, R.G., 1995

Cloning and characterization of a TFIIIC2 subunit (TFIIIC) whose presence correlates with activation of RNA polymerase III-mediated transcription by adenovirus E1A expression and serum factors.

Genes Dev. **9**, 675-685

Smith, D.R., Jackson, I.J. und Brown, D.D., 1984

Domains of the positive transcription factor specific for the *Xenopus* 5S RNA gene.

Cell **37**, 645-652

Sørensen, P.D., Simonsen, H. und Frederiksen, S., 1990

Nucleotide sequence of a human 5S rRNA gene.

Nucleic Acids Res. **18**, 3060

Sørensen, P.D. und Frederiksen, S., 1991

Characterization of human 5S rRNA genes.

Nucleic Acids Res. **19**, 4147-4151

Stefano, J.E., 1984

Purified Lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts.

Cell **36**, 145-154

Steinberg, T.H. und Burgess, R.R., 1992

Tagetitoxin inhibition of RNA polymerase III transcription results from enhanced pausing at discrete

sites and is template-dependent.

J. Biol. Chem. **267**, 20204-20211

Strauss, F. und Varshavsky, A., 1984

A protein binds to satellite DNA repeat at three specific sites that would be brought into mutual proximity by DNA folding in the nucleosome.

Cell **37**, 889-901

Svitkin, Y.V., Pause, A. und Sonenberg, N., 1994

La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA.

J. Virology **68**, 7001-7007

Swanson, R.N, Conesa, C., Lefebvre, O., Carles, C., Ruet, A., Quemeneur, E., Gagnon, J. und Sentenac, A., 1991

Isolation of TFC1, a gene encoding one of two DNA-binding subunits of yeast transcription factor tau (TFIIIC).

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 4887-4891

Taggart, A.K.P., Fisher, T.S. und Pugh, B.F., 1992

The TATA-binding protein and associated factors are components of pol III transcription factor TFIIIB.

Cell **71**, 1015-1028

Teichmann, 1995

Zusammensetzung unterschiedlicher Formen des menschlichen Transkriptionsfaktors IIIB und deren funktionelle Charakterisierung bei der Expression 5'- und genintern regulierter RNA Polymerase III Gene.

Promotionsarbeit am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

Teichmann, M. und Seifart, K.H., 1995

Physical separation of two different forms of human TFIIIB active in the transcription of the U6 or the VAI gene *in vitro*.

EMBO J. **14**, 5974-5983

Teichmann, M., Dieci, G., Huet, J., R  th, J., Sentenac, A. und Seifart, K.H., 1997

Functional interchangeability of TFIIIB components from yeast and human cells *in vitro*.

EMBO J. **16**, 4708-4716

Teichmann, M., Wang, Z., Ito, M., Me  sner, W., Seifart, K.H. und Roeder, R.G., 2000

Molecular cloning of human TFIIIB150 reveals that modified forms correlate with gene selective activities.

in Vorbereitung

Thomae, R., 2000

Die Regulation der Genexpression durch die RNA-Polymerase III während der Differenzierung von murinen F9-Zellen.

Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Thuillier, V., Stettler, S., Sentenac, A., Thuriaux, P. und Werner, M., 1995

A mutation in the C31 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III affects transcription initiation.

EMBO J. **14**, 351-359

Thuillier, V., Brun, I., Sentenac, A. und Werner, M., 1996

Mutations in the α -amanitin conserved domain of the largest subunit of yeast RNA polymerase III affect pausing, RNA cleavage and transcriptional transitions.

EMBO J. **15**, 618-629

Tiefenbach, J., 1998

Reinigung und Charakterisierung einer an die Terminationsregion Pol III transkribierter Gene bindenden Aktivität (TBA).

Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg

Udvardy, A. und Seifart, K.H., 1976

Transcription of specific genes in isolated nuclei from HeLa cells *in vitro*.

Eur. J. Biochem. **62**, 353-363

Van Horn, D.J., Yoo, C.J., Xue, D., Shi, H. und Wolin, S.L., 1997

The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: A conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation.

RNA **3**, 1434-1443

Vrana, K.E., Churchill, M.E., Tullius, T.D. und Brown, D.D., 1988

Mapping functional regions of transcription factor TFIIIA.

Mol. Cell. Biol. **8**, 1684-1696

Waldschmidt, R., Wanandi, I. und Seifart, K.H., 1991

Identification of transcription factors required for the expression of mammalian U6 genes *in vitro*.

EMBO J. **10**, 2595-2603

Wang, Z. und Roeder, R.G., 1995

Structure and function of a human transcription factor TFIIIB subunit that is evolutionarily conserved and contains both TFIIIB- and high-mobility-group protein 2-related domains.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 7026-7030

Wang, Z. und Roeder, R.G., 1996

TFIIIC1 acts through a downstream region to stabilize TFIIIC2 binding to RNA polymerase III

promotors.

Mol. Cell. Biol. **16**, 6841-6850

Wang, Z. und Roeder, R.G., 1997

Three human RNA polymerase specific subunits form a subcomplex with a selective function in specific transcription initiation.

Genes Dev **11**, 1315-1326

Wang, Z. und Roeder, R.G., 1998

DNA topoisomerase I and PC4 can interact with human TFIIIC to promote both accurate termination and transcription reinitiation by RNA polymerase III.

Molecular Cell **1**, 749-757

Weil, P.A., Segall, J., Ng, S.Y. und Roeder, R.G., 1979

Faithfull transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates.

J. Biol. Chem. **254**, 6163-6173

Werner, M., Hermann-Le Denmat, S., Treich, I., Sentenac, A. und Thuriaux, P., 1992

Effect of mutations in a zinc binding domain of yeast RNA polymerase C (III) on enzyme function and subunit association.

Mol. Cell. Biol. **12**, 1087-1095

Werner, M., Chaussivert, N., Willis, I.M. und Sentenac, A., 1993

Interaction between a complex of RNA polymerase III subunits and the 70-kDa component of transcription factor IIIB

J. Biol. Chem. **268**, 20721-20724

Whitehall, S.K., Bardeleben, C. und Kassavetis, G.A., 1994

Hydrolytic cleavage of nascent RNA in RNA polymerase III ternary transcription complexes.

J. Biol. Chem. **269**, 2299-2306

Wingender, E., Shi, X.P., Houpert, A., Seifart, K.H., 1984

Isolation of a transcription complex for ribosomal 5S RNA.

EMBO J. **3**, 1761-1768

Wingender, E., Franck, R., Blöcker, H., Wang, L., Jahn, D. und Seifart, K.H., 1988

Complete synthesis and transcription *in vitro* of a gene coding for human ribosomal 5S RNA.

Gene **64**, 77-85

Wolin, S.L. und Matera, A.G., 1999

The trials and travels of tRNA

Genes Dev. **13**, 1-10

Wu, G.J., Railey, J.F. und Cannon, R.E., 1987

Defining the functional domains in the control region of the adenovirus type 2 specific VARNA1 gene.
J. Mol. Biol. **194**, 423-442

Xiao, Q., Sharp, T.V., Jeffrey, I.W., James, M.C., Pruijn, G.J.M., Van Venrooij, W.J. und Clemens, M.J., 1994

The La antigen inhibits the activation of the interferon-inducible protein kinase PKR by sequestering and unwinding double-stranded RNA.
Nucleic Acids Res. **22**, 2512-2518

Yoo, C.J. und Wolin, S.L., 1994

La proteins from *Drosophila melanogaster* and *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth.
Mol. Cell. Biol. **14**, 5412-5424

Yoo, C.J. und Wolin, S.L., 1997

The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors.
Cell **89**, 393-402

Yoon, J.-B., Murphy, S., Bai, L., Wang, Z. und Roeder, R.G., 1995

Proximal sequence element binding transcription factor (PTF) is a multisubunit complex required for transcription of both RNA polymerase II- and RNA polymerase III-dependent small nuclear RNA genes.
Mol. Cell. Biol. **15**, 2019-2027

Yoshinaga, S.K., Boulanger, P.A. und Berk, A.J., 1987

Resolution of human transcription factor TFIIC into two functional components.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 3585-3589

Yoshinaga, S.K., L'Etoile, N.D. und Berk, A.J., 1989

Purification and characterization of transcription factor IIIC2.
J. Biol. Chem **264**, 10726-10731

8. Anhang

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Seifart danke ich für sein Vertrauen und seine Unterstützung sowohl in fachlicher wie auch in menschlicher Hinsicht, durch die diese Arbeit ermöglicht wurde. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Heldmaier für die Übernahme der Betreuung der Arbeit am Fachbereich Biologie danken und dafür, dass ich erst durch Praktika in seinem Labor Zugang zur Molekularbiologie gefunden habe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Wolfgang Meißner, der immer dafür gesorgt hat, dass der Laden läuft und mit dem man immer eine gute Flasche Wein trinken kann.

Herzlichen Dank auch an meine (z.T. ehemaligen) Kollegen Sarah Fehl, Christin Gruber; Heike Hafner, Frauke Härtel, Ingo Kober, Ulla Kopiniak, Susanne Oettel, Heike Rothfels, Hauke Schmidt, Frauke Seifart, Walter Stünkel, Martin Teichmann, Renate Thomae und Jens Tiefenbach für die sehr gute Kooperativität und die freundliche Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie alle Irrungen und Wirrungen der Studiumswahl mitgemacht und mich trotzdem weiter finanziert haben.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Doktorarbeit mit dem Thema:

Analyse einzelner Phasen des RNA Polymerase III Transkriptionszyklus

von mir selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden. Die Stellen, die aus anderen Texten sinngemäß oder im Wortlaut übernommen wurden, sind im Text durch Quellenangaben kenntlich gemacht.

Diese Doktorarbeit wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

Weser, S., Bachmann, M., Seifart, K.H. und Meißner, W., 2000

Transcription efficiency of human pol III genes *in vitro* does not depend on the RNP-forming autoantigen La.

Nucleic Acids Res. **28**, 3935-3942

Posterpräsentation mit Ergebnissen dieser Dissertation:

Oettel, S., Haertel, F., Weser, S., Meißner, W. und Seifart, K.H., 1998

Basal mechanisms of RNA polymerase III transcription in mammalian cells.

Asilomar, CA, USA: „RNA Polymerase I and III Transcription Conference“

Vortrag mit Ergebnissen dieser Arbeit:

Weser, S., Bachmann, M., Seifart, K.H. und Meißner, W., 2000

Isolation and characterization of human transcription complexes.

Asilomar, CA, USA: „RNA Polymerase I and III Transcription Conference“

Marburg, im Juli, 2000

Lebenslauf

von Stephan Weser

geboren am 7. 4. 1969 in Lübeck

1975-1979	Besuch der Tanneck Grundschule in Mölln
1779- 1988	Besuch der Lauenburgischen Gelehrtenschule in Ratzeburg, mit Abitur abgeschlossen
WS 1988/89	Aufnahme eines Studiums an der Philipps-Universität in Marburg in den Fächern Geographie und Geschichte, angestrebter Abschluss: Lehramt an Gymnasien
WS 1989/90	Fachwechsel von Geschichte zu Germanistik
WS 1990/91	Aufnahme des Biologiestudiums als drittes Prüfungsfach (Lehramt)
April 1991	Zwischenprüfung Geographie
Oktober 1992	Zwischenprüfung Biologie
SS 1993	Wechsel der Studienrichtung, angestrebter Abschluß: Diplombiologe
Oktober 1993 bis Juni 1994	Hilfswissenschaftliche Tätigkeit in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Ingrid Schmidt am MPI Bad Nauheim
April 1994	Vordiplom Biologie
Juli 1994-Oktober 1996	Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
Oktober 1995	Diplomhauptprüfung Biologie
Dezember 1995 bis November 1996	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Seifart, Thema: Untersuchungen zur inhibitorischen Wirkung von Tagetitoxin auf die <i>in vitro</i> Transkription der humanen RNA Polymerasen I und III
seit Januar 1997	Promotion am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Seifart